



ANNEE 2003

THESE : 2003 – TOU 3 – 4138

## **MALADIE D'AMAIGRISSEMENT DU PORCELET (MAP) :**

# **SUIVI LONGITUDINAL DE L'INFECTION NATURELLE PAR LE CIRCOVIRUS PORCIN DE TYPE 2 (PCV2) ET DES PARAMETRES HEMATOLOGIQUES ET LEUCOCYTAIRES DES PORCELETS**

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2003  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**Patrice NAVAL**

Né, le 4 avril 1978 à BERGERAC (Dordogne)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Guy-Pierre MARTINEAU

### **JURY**

PRESIDENT :  
**M. Henri DABERNAT**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEUR :  
**M. Guy-Pierre MARTINEAU**  
**Mlle Séverine BOULLIER**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :  
**Mme Mylène LEMAIRE-MEYER**

Docteur Vétérinaire



**A notre président de thèse,**

**Monsieur le Professeur DABERNAT**

Docteur en Médecine,  
Professeur des universités,  
Praticien des Hôpitaux,  
Chef de service,  
Laboratoire Microbiologie.

Pour le très grand honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence  
de notre jury de thèse.

Hommage respectueux.

**A notre jury de thèse,**

**Monsieur le Professeur MARTINEAU**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de basse-cour.

Qui nous a guidé tout au long de notre travail.  
Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

**Mademoiselle le Docteur BOULLIER**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Immunologie générale et médicale.

Qui, avec gentillesse, a bien voulu faire partie de ce jury.  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

**Madame le Docteur LEMAIRE-MEYER**

Docteur Vétérinaire.

Qui nous a fait l'honneur de nous accorder sa confiance pour ce travail.  
Dont la patience, les conseils et l'encadrement nous ont guidés avec  
précision.  
Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance et de  
notre profonde considération.

**Monsieur le Docteur BERNARD**

Docteur Vétérinaire.

Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

Nous tenons à remercier tout particulièrement :

Monsieur MEYNAUD pour son aide, sa volonté, sa motivation et la contention efficace de nos chers animaux !

Monsieur le Professeur DELVERDIER pour son aide lors de la lecture histologique des lames et de nous avoir accordé un peu de son temps.

Monsieur le Professeur GUELFY pour son aide précieuse et sa disponibilité lors des analyses hématologiques.

Monsieur BARANOWSKI pour son aide précieuse dans l'élaboration de la PCR.

Monsieur le Docteur FOUCRAS pour son aide précieuse lors de l'interprétation des résultats.

Monsieur le Docteur MEYER pour son aide et son soutien.

Le personnel du laboratoire de virologie bovine : Martine DEPLANCHE et Martine MOULIGNIE pour leur accueil, leur aide précieuse et leur dévouement.

Qu'elles trouvent ici l'expression de notre sincère gratitude.

Les éleveurs des régions Midi-Pyrénées et Aquitaine, pour leur accueil et leur précieuse collaboration dans cette étude.

*A mes parents,*

A qui je dois tout,

Que ce travail soit le symbole de l'amour que je leur voue,

Témoignage de ma profonde affection et reconnaissance pour leur amour et leur soutien de tout instant.

*A toute ma famille*

*A tous mes amis et connaissances pour les moments agréables passés ensemble*

*A Vincent, Sébastien, Séverine, Sophie, Valérie, Filipe pour toutes les joies du trivial poursuit, des sorties et de la bonne gastronomie...*

## **INTRODUCTION**

**6**

## **PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1 – la maladie d’amaigrissement du porcelet**

**8**

1-1 : Historique	8
1-2 : Aspects cliniques de la maladie d’amaigrissement du porcelet	9
1- 2-1 : Animaux et élevages atteints	9
1-2-2 : Symptômes généraux	10
1-2-3 : Symptômes respiratoires	11
1-2-4 : Symptômes digestifs et hépatiques	11
1-2-5 : Autres symptômes moins fréquents	12
1-3 : Aspects lésionnels de la maladie d’amaigrissement du porcelet	13
1-3-1 : Anatomie pathologique macroscopique	13
1-3-2 : Anatomie pathologique microscopique	16
1-4 : Examens complémentaires	19
1-4-1 : Hématologie : numération formule sanguine	19
1-4-2 : Résultats biochimiques	19
1-4-3 : Dosages des protéines sériques	20
1-5 : Répartition géographique et dans le temps	20
1-6 : Transmission	20
1-7 : Facteurs environnementaux et cofacteurs	21

### **2 – Le circovirus porcin de type 2 (PCV2)**

**23**

2-1 : Famille des Circoviridae	23
2-2 : Découverte des circovirus porcins de type 1 et 2	23
2-3 : Morphologie du circovirus porcin de type 2	24
2-4 : Génome et organisation	24
2-5 : Variabilité génomique	26
2-6 : Propriétés physico-chimiques	27

2-7 : Détection du circovirus porcin de type 2	27
2-7-1 : détection de l'agent viral	27
2-7-1-1 : Hybridation in situ	27
2-7-1-2 : Histochimie	28
2-7-1-3 : Polymerase chain reaction (PCR)	29
2-7-1-4 : Immuno Peroxydase Monolayer Assay (IPMA)	31
2-7-1-5 : Isolement viral	32
2-7-2 : Détection des anticorps anti-PCV2	32
2-7-2-1 : Immunofluorescence indirecte	32
2-7-2-2 : Méthode ELISA	33

### **3 – Modifications de la distribution des populations leucocytaires et de l'immunité humorale lors de l'infection par le PCV2 34**

3-1 : Immunité chez le porc	34
3-2 : Modifications de la distribution des populations leucocytaires lors de MAP	35
3-3 : Suivi de l'immunité humorale lors de l'infection par le PCV2	35

### **4 – Diagnostic de la maladie d'amaigrissement 37**

### **5 – Prévention et traitement de la maladie d'amaigrissement du porcelet 39**

5-1 : Essais de traitement et contrôle de la MAP	39
5-1-1 : Les 20 mesures de l'AFSSA	39
5-1-2 : Essais de traitements	40
5-1-3 : Sérothérapie	41
5-2 : Prévention vaccinale	42

## **PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE**

<b>1 – Objectifs</b>	<b>44</b>
<b>2 – Matériel et méthodes</b>	<b>45</b>
2-1 : Elevages et échantillons de porcelets	45
2-2 : Prélèvements	46
2-2-1 : Prélèvements d'échantillons sanguins et de matières fécales	46
2-2-2 : Suivi et questionnaire	47
2-2-3 : Détection des anticorps anti-PCV2 dans les fécès	47
2-2-4 : Numération et formule sanguine	49
2-2-5 : Distribution des populations leucocytaires	49
2-2-6 : Détection du PCV2	51
2-2-6-2 : Développement d'une PCR	51
2-2-6-1 : Test ELISA sur matières fécales	55
2-2-7 : Autopsies et analyses anatomopathologiques	56
<b>3 – Résultats</b>	<b>59</b>
3-1 : Elevages	59
3-2 : Suivi des anticorps anti-PCV2 dans les matières fécales	60
3-3 : Hématologie	61
3-4 : Distribution des populations leucocytaires sanguines	66
3-5 : Développement, mise au point et résultats d'un test PCR pour la détection spécifique du PCV2	73
3-6 : Détection de PCV2 par ELISA dans les fécès	78
3-7 : Analyses anatomopathologiques	79
<b>4 – Discussion</b>	<b>85</b>
<b><u>CONCLUSION GENERALE</u></b>	<b>95</b>
<b>Annexe</b>	<b>98</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>99</b>



## **Tableaux et illustrations**

### **TABLEAUX**

Tableau 1 : caractéristiques des élevages suivis	45
Tableau 2 : organisation des prélèvements	46
Tableau 3 : résultats de la détection du PCV2 par PCR nichée sur sérums	76
Tableau 4 : résultats de la PCR nichée sur sérums au cours du suivi longitudinal	77
Tableau 5 : récapitulatif des résultats du test ELISA antigène sur fécès	78
Tableau 6 : récapitulatif des résultats des autopsies dans l'élevage A	79
Tableau 7 : récapitulatif des résultats des autopsies dans l'élevage B	81
Tableau 8 : récapitulatif des lésions histologiques des animaux de l'élevage B	83

### **ILLUSTRATIONS**

Figure 1 : amaigrissement sur un porcelet atteint de MAP	10
Figure 2 : hypertrophie sévère d'un nœud lymphatique inguinal superficiel	11
Figure 3 : porcelet présentant une dermite	12
Figure 4 : hypertrophie des nœuds lymphatiques inguinaux	13
Figure 5 : poumon de porcelet atteint de MAP	14
Figure 6 : œdème du mésocolon	15
Figure 7 : coupe histologique d'un nœud lymphatique	17
Figure 8 : particules virales du PCV2	24
Figure 9 : représentation schématique du génome du PCV2	26
Figure 10 : étapes d'un cycle de PCR	30
Figure 11 : principe du test ELISA de blocage	48
Figure 12 : description des cycles utilisés en PCR1	53
Figure 13 : description des cycles utilisés en PCR2	54
Figure 14 : principe du test ELISA de type « sandwich »	56
Figure 15 : évolution des moyennes des anticorps anti-PCV2 par ELISA	61
Figure 16 : analyse du nombre de globules rouges dans les 2 élevages	61
Figure 17 : analyse du taux d'hémoglobine dans les 2 élevages	62
Figure 18 : analyse du taux d'hématocrite dans les 2 élevages	63
Figure 19 : analyse du nombre de globules blancs dans les 2 élevages	63

Figure 20 : analyse du pourcentage de lymphocytes	64
Figure 21 : analyse du pourcentage de granulocytes	65
Figure 22 : analyse du pourcentage de monocytes	65
Figure 23 : histogramme d'acquisition au cytomètre de flux	66
Figure 24 : analyse par cytométrie en flux du taux de CD4+	67
Figure 25 : analyse par cytométrie en flux du taux de CD8+	68
Figure 26 : analyse par cytométrie en flux du rapport CD4+/CD8+	69
Figure 27 : analyse par cytométrie en flux du taux de monocytes	70
Figure 28 : analyse par cytométrie en flux du taux de lymphocytes B	71
Figure 29 : analyse par cytométrie en flux du taux de CD16 (cellules NK)	72
Figure 30 : produits d'amplification en PCR1 du PCV2	73
Figure 31 : produits d'amplification en PCR2 du PCV2	74
Figure 32 : produits d'amplification en PCR1 du PCV1	74
Figure 33 : produits d'amplification en PCR2 du PCV1	75

# INTRODUCTION

La Maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) constitue un syndrome qui a émergé, au milieu des années 1990, dans les bassins de production porcine de l'Amérique du Nord, du Sud-Est Asiatique et de l'Europe (ITP, 2001 ; Kennedy *et al.*, 2000). En France, elle se manifeste sur des porcelets à partir de 6 à 8 semaines d'âge, jusqu'à 16 semaines (Gambade *et al.*, 2000 ; Madec *et al.*, 2000). Elle est caractérisée par un dépérissement rapide avec une fonte musculaire, rebelle aux traitements et souvent fatale. Ce syndrome est responsable de mortalités importantes de 10 à 20 % (ITP, 2001 ; Gambade *et al.*, 2000).

Un nouveau circovirus porcin, le circovirus porcin de type 2 (PCV2) jouerait un rôle central dans l'étiologie de la MAP (Allan *et al.*, 1998, 1999 ; Kennedy *et al.*, 2000). Le PCV2 est associé à la MAP, mais sa capacité à induire seul la maladie ne paraît pas évidente (Balasch *et al.*, 1999), la présence de cofacteurs semble déterminante dans l'apparition de la maladie (Allan *et al.*, 1999, 2000). Au sein du même élevage atteint, la majorité des porcs ne présentent aucun signe clinique de MAP alors que les autres sont sévèrement affectés (Madec *et al.*, 2000). De plus, les données actuelles montrent que l'infection par le PCV2 est largement répandue et présente dans la majorité des élevages atteints ou non de MAP (Thomson *et al.*, 2000). De plus, la présence d'anticorps anti-PCV2 a été mise en évidence dans des sérums prélevés au moins 15 ans avant l'apparition de la MAP (Allan *et al.*, 2000). Le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) est considéré comme le principal cofacteur de type infectieux (Allan *et al.*, 2000 ; Kennedy *et al.*, 2000). Toutefois la maladie est décrite dans des élevages négatifs au SDRPV (Madec *et al.*, 2000). Parmi les facteurs non infectieux, il y a ceux liés à l'élevage et ceux intrinsèques aux animaux. Il apparaît aujourd'hui que le statut immunitaire de l'animal semble jouer un rôle clef dans l'apparition de la MAP (Allan *et al.*, 2000 ; Krakowka *et al.*, 2001 ; Kyriakis *et al.*, 2002).

Dans une première partie, nous proposerons une synthèse de la littérature relative à la maladie, son agent étiologique, l'immunité, le diagnostic et la prévention. Dans un deuxième temps, nous présenterons les résultats obtenus à partir du suivi longitudinal de l'infection par le PCV2 et des paramètres hématologiques et leucocytaires, réalisé sur le terrain, dans deux élevages (un atteint de MAP et l'autre indemne).

## **PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **1 – La maladie d’amaigrissement du porcelet**

## **1-1 Historique**

Ce syndrome, appelé en français maladie d’amaigrissement du porcelet (MAP) et Outre-atlantique syndrome du dépérissement du porcelet (Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS) est une affection récente qui a émergé au milieu des années 1990 dans les bassins de production porcine de l’Europe, de l’Amérique du Nord et par la suite dans le monde entier (Kennedy *et al.*, 2000).

Les recherches scientifiques ont montré qu’un circovirus porcin d’un type jusque-là inconnu, le circovirus porcin de type 2 (PCV2) avait un rôle dans l’étiologie de la MAP.

De nombreux essais de reproduction de la MAP ont été publiés. Au début, des lésions légères à modérées étaient reproduites mais pas ou peu les signes cliniques, ce qui laissait penser à l’intervention d’autres co-facteurs. Toutefois, de récentes études sur des porcs issus de césariennes et privés de colostrum ont réussi à aboutir aux signes cliniques et aux lésions (Harms, 2001 ; Bolin *et al.*, 2001). Cependant la plupart de ces études n’ont été réalisées qu’une seule fois et la répétitivité n’a pas été testée. De plus, d’un point de vue expérimental, il est possible qu’un nombre important de facteurs comme l’âge de porcelets, la source de porcelets (conventionnels, privés de colostrum, gnotobiotiques, SPF), la génétique, le dosage de PCV2 peut jouer un rôle significatif dans le développement de la maladie (Segalés et Domingo, 2002).

Outre la MAP, le PCV2 a été également associé à d’autres maladies du porc : le syndrome de dermatite néphrite, des problèmes de reproduction avec de la mortinatalité, la momification et la myocardite des fœtus, des tremblements congénitaux (Harding *et al.*, 2001), même si récemment ils ont été fortement remis en question.

## **1-2 Aspects cliniques de la maladie d'amaigrissement du porcelet**

### **1-2-1 Animaux et élevages atteints**

Les manifestations de cette maladie sont très variées et nous allons essayer de les passer en revue pour pouvoir en tirer l'essentiel dans la pratique de tous les jours.

L'espèce concernée est l'espèce porcine. Aucune donnée n'est disponible concernant la présence d'anticorps anti-PCV2 chez d'autres espèces. En revanche, des anticorps sériques contre le PCV1 ont été détectés chez les humains (30,2%), la souris (12 à 69%) et le bétail (35%) en Allemagne par des techniques d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA (Tischer *et al.*, 1995).

La MAP affecte le plus fréquemment les porcs de 8 à 14 semaines d'âge, bien qu'elle est été décrite chez des porcs de un à 6 mois d'âge. Seule une étude japonaise a décrit l'apparition de MAP chez des porcelets de trois jours (citée par Segales et Domingo, 2002).

Ce syndrome est décrit dans presque tous les types d'élevage, incluant les élevages naisseurs engraisseurs et les élevages multisites et de taille variables de 30 à 10000 truies (Segales et Domingo, 2002). Une étude longitudinale sur des verrats naturellement infectés par le PCV2 a montré une période de virémie d'au moins 3 mois et que le génome du PCV2 était retrouvé dans le sang et la semence (Le Tallec *et al.*, 2001). Une autre étude a montré une très forte séroprévalence (plus de 95%) dans les centres d'insémination artificielle (Pozzi *et al.*, 2001).

Dans une étude française, il a été observé que la plupart des porcs développant la maladie correspondaient à quelques portées, supposant un effet portée possible (Madec *et al.*, 2000). Une autre étude a montré que les porcs mâles castrés étaient plus susceptibles à la maladie que les femelles, une observation similaire a été rapportée aussi en Espagne (Rodriguez-Arrioja *et al.*, 2002).

La morbidité et la mortalité associées à la MAP varient selon le stade de la maladie et la gestion de l'élevage affecté. Lors d'un épisode aigu, le taux de mortalité peut atteindre 10%, alors que la morbidité et la mortalité dans les élevages infectés de manière enzootique sont moindres (Allan et Ellis, 2000). Dans une autre publication, les taux usuels sont de 4 à 30% de morbidité et parfois jusqu'à 80% de mortalité (Ségallès *et al.*, 2000). De nombreux aspects épidémiologiques sur l'infection par le PCV2 et sur la MAP sont encore inconnus.

### 1-2-2 Symptômes généraux

Les porcelets présentent une atteinte de l'état général avec notamment de l'hyperthermie pouvant aller jusqu'à 40,5 à 41,5°C, une perte de poids plus ou moins marquée mais habituellement très rapide selon l'historique de la maladie dans l'élevage et sa durée d'évolution (Balasch *et al.*, 1999).

Les porcelets montrent aussi une léthargie, tristesse, refus à se mouvoir, prostration (Allan *et al.*, 1999).

L'amaigrissement est à l'origine d'une hétérogénéité des poids mettant en évidence une ligne dorsale bien délimitée (figure 1) et facilement identifiable dans une bande de porcelets donnée (document ITP, 2001).

De plus une polyadénomégalie est cliniquement détectée lors de la palpation du creux de l'aîne avec une hypertrophie des nœuds lymphatiques inguinaux superficiels (figure 2) jusqu'à cinq fois la taille normale (Harding *et al.*, 2001).



Figure 1: porcelet atteint de MAP présentant un amaigrissement marqué et une ligne du dos nettement visible (à gauche). Hétérogénéité des poids (porcelet couché à droite), facilement identifiable dans une bande de porcelet donnée.

Source : <http://thepigsite.com>



Figure 2 : porcelet atteint de MAP, présentant une hypertrophie sévère du nœud lymphatique inguinal superficiel, facilement visible à l'œil nu et à la palpation. Source : <http://thepigsite.com>.

### 1-2-3 Symptômes respiratoires

On peut facilement entendre chez les animaux malades de la toux et remarquer une polypnée, dyspnée marquant une détresse respiratoire (Gambade *et al.*, 2000) et surtout signant une pneumonie interstitielle.

### 1-2-4 Symptômes digestifs et hépatiques

Une diarrhée aqueuse non hémorragique, parfois profuse est fréquemment associée à cette maladie (Balasch *et al.*, 1999).

Il est à noter parfois la présence d'un ictère, moins fréquent en France qu'aux Etats-Unis, à l'origine d'une coloration jaune plus ou moins soutenue de l'animal (Kennedy *et al.*, 2000).



#### 1-2-5 Autres symptômes moins fréquents

Des manifestations cutanées sont parfois décrites. Il s'agit d'une dermatite avec la présence de papules, plaques rouges violacées devenant croûteuses et une cyanose des extrémités des oreilles et de la région périnéale (figure 3) (Madec *et al.*, 2000). Le poil est parfois piqué. Tout ceci évoque une autre maladie, appelée syndrome dermatite-néphropathie, rapportée chez le porc en engraissement où le circovirus porcin de type 2 est également suspecté être l'agent étiologique (Drolet *et al.*, 1999).

D'autres signes ont été relevés comme des arthrites des membres postérieurs avec des articulations chaudes et douloureuses aboutissant à des oedèmes (Wellenberg *et al.*, 2000).

Dans des cas extrêmement rares, il a même été décrit une mort subite du porcelet (Harding *et al.*, 2001).

La présence du circovirus porcin de type 2 a été également signalée dans des problèmes de reproduction chez des truies présentant des avortements, des mort-nés, momifications fœtales et des porcelets possédant des lésions de myocardite (Harding *et al.*, 2001 ; O'Connor *et al.*, 2001).



Figure 3 : porc présentant une dermatite, avec présence de papules, croûtes, et cyanose des oreilles. Source : <http://thepigsite.com>

### **1-3 Aspects lésionnels de la maladie d'amaigrissement du porcelet**

Le diagnostic de la maladie d'amaigrissement du porcelet peut être orienté par la mise en évidence de lésions évocatrices, qu'elles soient visibles directement lors de l'autopsie ou après analyses histologiques.

#### **1-3-1 Anatomie pathologique macroscopique**

##### **a- atteinte des organes lymphoïdes**

D'une part une lymphadénopathie plus ou moins sévère est à noter quasi systématiquement. Les nœuds lymphatiques inguinaux superficiels, mésentériques, trachéobronchiques, médiastinaux et sous-mandibulaires sont hypertrophiés, pouvant être cinq fois plus volumineux que la normale (figure 4) (Gambade *et al.*, 2000).

Des lésions de nécroses multifocales à coalescentes sont macroscopiquement visibles avec un aspect blanchâtre à la coupe. En phase terminale de la maladie, on peut remarquer une atrophie de ces tissus (Segales *et al.*, 2001).

D'autre part, on peut mettre en évidence une hypertrophie de la rate et des plaques de Peyer (Balasch *et al.*, 1999).



Figure 4 : hypertrophie des noeuds lymphatiques inguinaux sur des porcs atteint de MAP. Pour comparaison, le nœud lymphatique de gauche est de taille et volume normaux.

Source : <http://thepigsite.com>

### b- Lésions de l'appareil respiratoire

On constate fréquemment une atteinte des poumons. Ils sont rouges, non collabés et diverses lésions peuvent se présenter comme une pleurésie diffuse au niveau des lobes diaphragmatiques, une pneumonie interstitielle (figure 5) diffuse, exsudative (Gambade *et al.*, 2000) ou encore une broncho-pneumonie catarrhale au niveau des lobes apicaux (Wellenberg *et al.*, 2000).

Chez certains animaux malades, on peut remarquer l'accumulation de liquide dans la cavité thoracique (hydrothorax) et un œdème pulmonaire interstitiel (Allan *et al.*, 1999).



Figure 5: poumon de porcelet atteint de MAP. Le poumon est rouge et on peut noter une pneumonie avec un poumon en damier (pneumonie interstitielle).

Source : <http://thepigsite.com>

### c- Lésions hépatiques

En fonction du stade de la maladie, on peut observer une hépatomégalie ou une atrophie du foie, une décoloration jaune-orangée sur des animaux présentant un ictère (Segales *et al.*, 2001).

Une décoloration diffuse et superficielle du foie, une dégénérescence en tâches donnent à cet organe un aspect marbré. De plus, une cholangiohépatite est une lésion présente lors de l'évolution de cette maladie (Gambade *et al.*, 2000).

#### d- Lésions rénales

De multiples foyers pâles, de taille variable sont visibles sur les reins décapsulés (Segales *et al.*, 2001). Des hémorragies à la jonction cortico-médullaire, une hypertrophie rénale, des oedèmes du bassinet et périrénaux sont parfois trouvés (Kennedy *et al.*, 2000).

Une néphrite interstitielle avec des pétéchie en surface donne un aspect en « œuf de dinde ». Des kystes et une décoloration de la corticale sont également mis en évidence lors de l'examen nécropsique macroscopique (Gambade *et al.*, 2000).

#### e- Lésions de l'appareil digestif et du pancréas

Il est très fréquent de rencontrer un œdème du mésocolon (figure 6), du jéjunum, une entérite avec un contenu intestinal liquide, surtout au niveau du gros intestin.

Des ulcères fundiques gastriques sont signalés (Gambade *et al.*, 2000).

Une dilatation du caecum et une inflammation de la muqueuse peuvent être visibles.

Le pancréas est parfois hypertrophié et présente un œdème plus ou moins marqué (Gambade *et al.*, 2000).

Une péritonite chronique avec de multiples abcès intra-abdominaux, présentant des suffusions sur le feuillet péritonéal viscéral est moins fréquemment observée lors de l'autopsie. Une ascite peut aussi être présente (Wellenberg *et al.*, 2000).

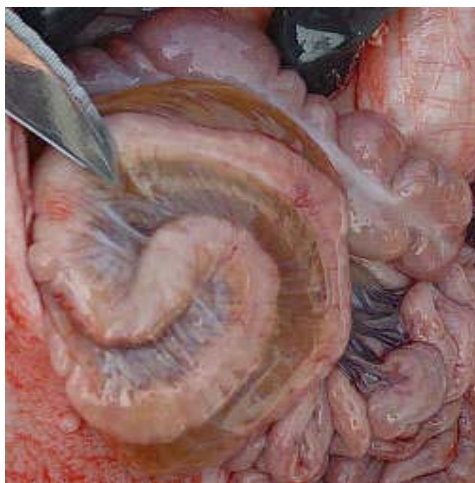


Figure 6 : porcelet atteint de MAP et présentant un œdème sévère du mésocolon. Source : <http://thepigsite.com>

### *f- Autres lésions inconstantes*

D'autres lésions peuvent être rencontrées de manière inconstante telles un œdème des tissus musculaires et sous-cutanés (Kennedy *et al.*, 2000), un œdème du péricarde, une pâleur du cœur et une péricardite fibreuse (Gambade *et al.*, 2000).

## 1-3-2 Anatomie pathologique microscopique

### *a- Prélèvements et analyses*

Les lésions siègent préférentiellement au niveau des différents organes lymphoïdes (nœuds lymphatiques, rate, tonsilles, plaques de Peyer) mais également au niveau des différents organes : poumon, foie, reins, intestins, cerveau et autres sont collectés lors de l'autopsie et fixés dans le formol à 10 %. Ces tissus sont ensuite déshydratés par différents passages dans des solutions alcooliques. Des coupes de ces organes inclus dans la paraffine sont réalisées puis colorés à l'hémalun-éosine et analysés au microscope.

### *b- Lésions microscopiques des organes lymphoïdes*

On observe une infiltration histiocytaire multifocale à diffuse du cortex et paracortex avec la présence de macrophages épithélioïdes (cellules à noyau rond ou ovale hypochrome et à nucléoles proéminents) présentant des inclusions cytoplasmiques (figure 7) et nucléaires. Ces inclusions sont souvent multiples et sphériques. Des syncytias sont visibles dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes, la médullaire et les sinusoides sous-capsulaires. Quasi systématiquement, on note une déplétion lymphocytaire et une augmentation des images de pycnose et de caryorrhexie dans les follicules ainsi qu'une fibrose du stroma (Kennedy *et al.*, 2000).

Les amygdales (tonsilles palatines) présentent également une déplétion lymphocytaire, une histiocytose et des inclusions cellulaires (Gambade *et al.*, 2000).

En ce qui concerne la rate, on pourra noter une infiltration macrophagique et une déplétion lymphocytaire dans les follicules, avec des inclusions cytoplasmiques et nucléaires et des syncytias.

Les plaques de Peyer présentent aussi une déplétion lymphocytaire et une infiltration macrophagique avec des inclusions et syncytias ainsi qu'une prolifération stromale et un abondant matériel hyalin dans les follicules les plus sévèrement affectés.

On note aussi une hypoplasie lymphocytaire thymique, une infiltration macrophagique du cortex et de la médulla dans le thymus (Kennedy *et al.*, 2000).

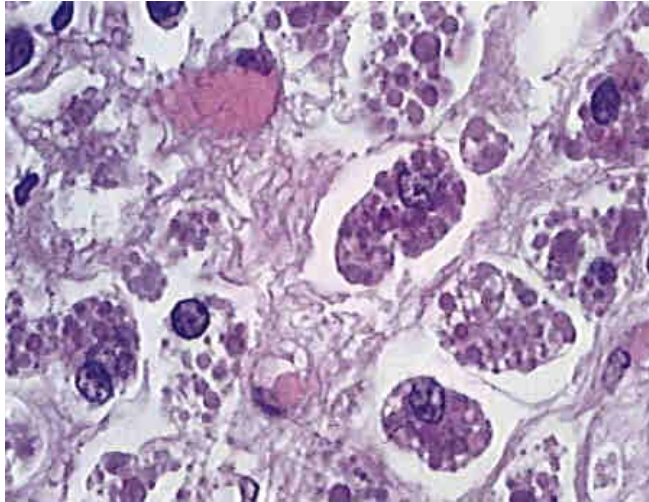


Figure 7 : vue microscopique d'une coupe histologique colorée à l'hémalun-éosine d'un nœud lymphatique présentant des corps d'inclusions cytoplasmiques dans les macrophages. Source : <http://thepigsite.com>

### c- lésions microscopiques de l'appareil respiratoire

On observe une pneumonie interstitielle avec infiltration multifocale à diffuse de macrophages dans le BALT (tissu lymphoïde associé aux bronches), le tissu interstitiel péribronchique, péribronchiolaire et du septum alvéolaire.

Les alvéoles, les bronchioles, les bronches contiennent parfois un nombre important de macrophages et de débris cellulaires (Kennedy *et al.*, 2000).

De plus, un œdème interlobulaire modéré multifocal, une péribronchiolite lymphoplasmocytaire, une alvéolite sérocellulaire avec des lésions de fibrose sont parfois visualisés (Gambade *et al.*, 2000).

#### d- lésions microscopiques hépatiques

Lors d'atteinte hépatique, l'histologie révèle une cholangiohépatite avec une infiltration lymphohistiocytaire des régions centroacineuses, une hépatite multifocale à diffuse et une infiltration lymphohistiocytaire de toutes les régions du lobule hépatique.

Des lésions de nécrose focale à diffuse dans des hépatocytes, une hyperplasie des cellules de Küpffer et une augmentation du nombre de cellules mononuclées dans les sinusoides hépatiques sont présentes (Kennedy *et al.*, 2000).

Parfois on peut mettre en évidence une fibrose périlobulaire et un manque massif d'hépatocytes lors de l'examen histologique des porcelets malades (Rosell *et al.*, 2000).

#### e- lésions microscopiques rénales

Les reins sont également des organes où certaines lésions sont présentes comme une pyélite avec une congestion marquée du bassinet rénal, une néphrite interstitielle avec une infiltration lymphoplasmocytaire, une nécrose épithéliale tubulaire (Kennedy *et al.*, 2000).

On peut plus rarement observer des glomérulopathies membranoprolifératives (Wellenberg *et al.*, 2000).

#### f-lésions microscopiques de l'appareil digestif et du pancréas

Une infiltration macrophagique de la lamina propria et de la sous-muqueuse de l'iléon, caecum, colon (Kennedy *et al.*, 2000), ainsi qu'une nécrose multifocale de la muqueuse de l'intestin grêle, des hémorragies et œdèmes de la sous-muqueuse sont parfois visibles (Gambade *et al.*, 2000).

Une nécrose focale à multifocale du tissu acineux pancréatique est présente ainsi qu'une fibrose et infiltration par des cellules mononuclées (Kennedy *et al.*, 2000).

#### g- autres lésions microscopiques d'organes

Plus rarement, on peut aussi constater la présence d'une infiltration de cellules mononuclées dans le myocarde ainsi qu'une infiltration macrophagique de la tunique albuginée jusque dans l'interstitium testiculaire et épидидymaire (Kennedy *et al.*, 2000).

Si on étudie les lésions cérébrales, on peut noter la présence de méningite avec infiltration macrophagique des méninges et des plexus choroïdes (Wellenberg *et al.*, 2000).

## **1-4 Examens complémentaires**

### **1-4-1 Hématologie : numération-formule sanguine**

La numération peut s'effectuer avec un automate réglé sur les paramètres de l'espèce porcine à partir d'une prise de sang sur EDTA. La formule sanguine est déterminée au microscope à partir d'un frottis coloré au May Grunwald Giemsa (MGG).

On constate une inversion de la formule sanguine avec une lymphopénie importante (Gambade *et al.*, 2000). De plus, l'hémogramme met en évidence une anémie avec une baisse du taux d'hémoglobine, du volume globulaire moyen (VGM) et de l'hématocrite (Martelli *et al.*, 2001).

Cette anémie peut cependant s'expliquer parfois par la présence d'ulcères gastriques dans la partie oesophagienne de l'estomac avec une baisse de la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), et du VGM. Cela confirme ainsi une anémie hypochrome microcytaire, ayant pour origine une perte de sang et de fer en accord avec la présence d'ulcères (Segales *et al.*, 2000). Les porcelets malades voient leur nombre de globules blancs augmenter surtout les granulocytes polynucléaires neutrophiles (Ségaies *et al.*, 2001).

### **1-4-2 Résultats biochimiques**

L'analyse biochimique se révèle plutôt décevante dans son ensemble par rapport aux signes cliniques et aux lésions mais elle a été peu étudiée.

On peut noter une bilirubinémie sur les sujets ictériques. L'amylasémie augmente sensiblement mais le lien avec les lésions des organes reste difficile à établir.

Les transaminases hépatiques ne s'accroissent que tardivement malgré les lésions du foie.

En revanche, urémie et créatininémie sont à peu près stables même sur les sujets ayant des lésions rénales (Gambade *et al.*, 2000).



### 1-4-3 Dosage des protéines sériques

Les dosages des protéines sériques se font par électrophorèse : une hypoprotéïnémie est mise en évidence sur des porcs présentant des oedèmes sous-cutanés, pulmonaires et pancréatiques. Sur d'autres porcs malades, on note une augmentation des bêta et gamma-globulines sur l'électrophorégramme. Là encore, ce type de mesure a été très peu étudié et une partie des résultats doivent encore être confirmée (Gambade *et al.*, 2000).

### 1-5 Répartition géographique et dans le temps

En ce qui concerne la répartition dans le temps, il existe différentes formes : aiguës et plus ou moins chroniques. Il existe parfois une persistance d'un impact aigu de la maladie pendant une longue période dans un même élevage, parfois plus d'un an et demi (Segales et Domingo, 2002).

En ce qui concerne la répartition dans l'espace, la MAP a été identifiée initialement en 1991 au Canada. La maladie a ensuite été rapportée aux USA en 1996, en France et en Espagne en 1997, puis au Danemark, en Irlande en 1998 et en Allemagne et Corée du Nord en 1999 (Kennedy *et al.*, 2000). Depuis elle est décrite sur tous les continents ayant des porcs d'élevage sauf l'Océanie (Allan et Ellis, 2000). Cependant certains pays semblent moins affectés comme, par exemple, la Belgique.

D'un point de vue sérologique, l'infection est largement répandue à travers le monde. De plus, des données de différents pays européens montrent une séroprévalence de presque 100% dans les élevages, indiquant que l'infection par le PCV2 apparaît à la fois dans des élevages indemnes ou non de MAP (Rose *et al.*, 2001 ; Sibila *et al.*, 2001).

### 1-6 Transmission

Peu de données sont disponibles concernant les sources de la maladie. Les porcs semblent être la principale source.

L'inoculation intra-nasale du PCV2 à des porcs sains indemnes de SDRP montre que ces animaux sont tous infectés et on retrouve de l'ADN viral d'où l'hypothèse d'une transmission par voie nasale (Balasch *et al.*, 1999).

Une étude plus récente a montré que les porcs pouvaient héberger du PCV2 dans les cavités nasales sans être virémiques ou présenter des signes cliniques (Sibila *et al.*, 2001).

De plus, du PCV2 a été mis en évidence dans les cavités nasales dans des proportions plus forte que dans le sérum. Une autre étude a montré que le PCV2 pouvait être détecté par PCR dans des échantillons nasaux, d'amygdales, bronchiques, dans l'urine et les fécès. Ceci est en faveur d'une transmission horizontale directe par sécrétion oro-nasale, fécales et ou urinaire lors de contact étroit (Calsamiglia *et al.*, 2002).

L'émergence d'une hypothèse de transmission verticale est apparue récemment. En effet, une association de PCV2 avec des avortements a été documentée au Canada (West *et al.*, 1999). Des antigènes PCV2 ont été identifiés dans des lésions d'avortons et du PCV2 a été isolé des tissus fœtaux. Après infection expérimentale de porcelets gnotobiotiques d'un jour avec un isolat de culture cellulaire infectée par du PCV2, l'acide nucléique du virus a été détecté dans les fécès et la salive 31 jours après inoculation (Allan et Ellis, 2000).

Une étude a été réalisée pour savoir si le PCV2 pouvait infecter les fœtus quand il était inoculé à différents stades de la gestation (Pensaert *et al.*, 2001). Il est apparu clairement qu'une fois que le virus avait infecté les fœtus, des pathologies et morts fœtales survenaient autour du milieu de la gestation. En revanche, si l'infection était plus tardive, des pathologies pouvaient ou non être présentes (Pensaert *et al.*, 2001).

### **1-7 Facteurs environnementaux et cofacteurs**

Des facteurs environnementaux comme la surpopulation, la mauvaise qualité de l'air, le mélange de porcs d'âges différents et différents stress peuvent exacerber la sévérité de la maladie.

D'autres infections ou maladies ont été trouvées en association avec le PCV2. Parmi celles-ci, on peut citer la maladie d'Aujeszky, le syndrome dysgénétique et respiratoire porcin (SDRP), la parvovirose (Allan *et al.*, 1999, 2000 ; Ellis *et al.*, 1999, Kennedy *et al.*, 2000, Harms *et al.*, 2001), la maladie de Glässer, la méningite streptococcique, la salmonellose, la colibacillose, des diarrhées non spécifiques, une bronchopneumonie suppurative ou encore une infection à mycoplasmes (Pallarés *et al.*, 2002). De toutes ces maladies ou infections, le SDRP a été principalement concerné dans l'industrie porcine à cause de sa similarité clinique avec la

MAP et son haut pourcentage d'élevages ou de porcs présentant les virus du SDRP et de la MAP en même temps (Segalés et Domingo, 2002).

Tous les résultats de l'inoculation de PCV2 avec d'autres virus ont mené à de nouvelles hypothèses sur la pathogénie de ce syndrome. Récemment, l'immunostimulation systémique ou locale avec un immunogène non infectieux incorporé dans un adjuvant fort (adjuvant de Freund) a abouti à une potentialisation de la MAP. Une activation immunitaire serait un facteur déclenchant de la MAP et un évènement clé dans la pathogénie du PCV2 (Krakowka *et al.*, 2001).

## **2- Le circovirus porcin de type 2 (PCV2)**

### **2-1 La famille des Circoviridae**

Le circovirus porcin de type 2 appartient à la famille des Circoviridae dont un seul genre est connu, le genre circovirus. Le virus type est celui de l'anémie infectieuse du poulet. Cette famille inclut également le virus de la maladie du bec et des plumes des Psittacidés et les circovirus porcins (Murphy *et al.*, 1983).

Des circovirus de plantes ont également été retrouvés comme le virus du dépérissement foliaire de la noix de coco (coconut foliar decay virus, CFDV), un virus affectant le trèfle souterrain (subterranean clover stunt virus, SCSV) et un virus de la banane (banana bunchy top virus, BBTV). Ces virus possèdent tous des petits virions symétriques et un génome à ADN circulaire (Meehan *et al.*, 1997).

Un autre groupe de virus inféodés aux plantes avec un petit génome à ADN circulaire appartient à la famille des Geminiviridae (Mankertz *et al.*, 1998). Tous ces circovirus et gémivirus sont les plus petits virus connus des plantes et des animaux.

### **2-2 Découverte des circovirus porcins de type 1 et 2**

Le circovirus porcin de type 1 (PCV1) a été découvert dans des cultures de lignées cellulaires de reins de porc (lignée PK-15). Ces lignées cellulaires étaient infectées par un petit virus, non cytopathogène, au départ supposé à ARN. Cet agent a alors été étudié en détail, il s'agissait d'un virus d'un diamètre de 17 nanomètres et contenant un simple brin d'ADN circulaire de 1,76 kilo bases. Seuls les porcs possédaient des anticorps dirigés contre ce virus et il a été nommé circovirus porcin (Tischer *et al.*, 1982).

Plus récemment, on a noté l'émergence d'un nouveau circovirus, le circovirus porcin de type 2 (PCV2), distinct d'un point de vue antigénique et génomique, dans la population porcine et associé à des signes cliniques tels que la MAP (Allan et Ellis, 2000).

Le PCV2 montre plus de 96% d'homologie de la séquence nucléotidique dans les différents pays où il a été isolé mais il est significativement différent du circovirus contaminant les lignées de cellules de reins de porc (moins de 80% d'homologie). Ceci a suggéré un nouveau circovirus, d'où le nom de circovirus porcin de type 2 (PCV2), le type 1 représentant le contaminant des cultures (Allan *et al.*, 1999).

### **2-3 Morphologie du PCV2**

Le circovirus porcin de type 2 est un virus non enveloppé sphérique, avec une capside de symétrie icosaédrique, de 17 nanomètres de diamètre (figure 8). Le génome est composé d'une molécule simple brin circulaire d'ADN de 1,7 kilo bases. La séquence complète du circovirus a été déterminée et contient 1767-1768 nucléotides (Murphy *et al.*, 1999).

Il existe d'importantes similitudes entre les génomes des circovirus qui infectent les vertébrés et les nanovirus des plantes. L'analyse de la séquence protéique de réplication codée par le cadre ouvert de lecture ou Open Reading Frame(ORF 1) indique un fort degré d'homologie avec l'ORF du nanovirus des plantes codant pour la protéine de réplication (Jestin *et al.*, 2001).

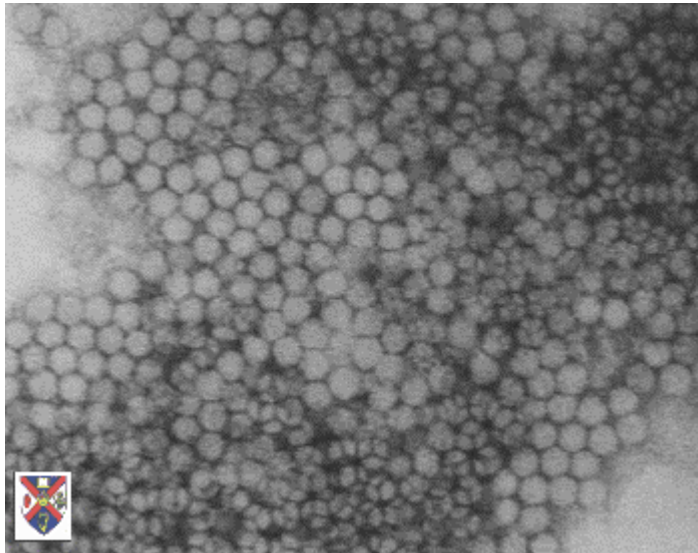


Figure 8 : particules virales du circovirus porcin de type 2 au microscope électronique. Source : [www.qub.ac.uk](http://www.qub.ac.uk).

### **2-4 Génome et organisation**

Les circovirus porcins de type 1 et 2 possèdent 11 cadres ouverts de lectures (ORF, figure 9). L'emplacement et l'orientation de ces ORF sont similaires, les protéines codant pour ORF 1 et ORF 2 ont la même taille. Les ORF 3 à 11 du PCV2 sont plus petits que ceux du PCV1 (sauf pour ORF 9 et 10). Ces différences dans les protéines codées chez le PCV2 sont peut-être des facteurs contribuant à la pathogénicité du PCV2 (Jestin *et al.*, 2001).

Trois ARN messagers du PCV1 ont été isolés : deux sont codés par le brin négatif et l'autre par le brin positif. Ce dernier est épissé et correspond à la synthèse spécifique de ORF 2. Trois ARN spécifiques ont été détectés dans les cellules infectées par le PCV2 dont un qui code pour une protéine de la capside virale. ORF 1 est le plus large cadre ouvert de lecture et code pour une protéine associée à la réplication spécifique du virus (Rep), de 314 acides aminés chez le PCV2 et 312 chez le PCV1 (Mankertz *et al.*, 1998). La longueur des protéines codées par ORF 2 est de 233 acides aminés chez les deux circovirus. Une protéine de structure majeure du PCV2 est codée par ORF 2 et a un poids moléculaire de 30 kDa, alors que celle du PCV1 est de 36 kDa (Nawagitgul *et al.*, 2000).

La réplication virale a lieu dans le noyau et dépend de protéines produites durant la phase S du cycle cellulaire. Elle est probablement à l'origine de l'apparition d'un grand nombre de corps d'inclusions intranucléaires. Le circovirus avec son simple brin d'ADN utilise l'ADN polymérase cellulaire pour synthétiser l'ADN double brin qui sera alors transcrit dans le noyau. Les transcrits subissent ensuite un épissage et produisent alors les ARN messagers (Murphy *et al.*, 1999). Une séquence pouvant former une structure en tige et boucle est présente et entoure le nonanucléotide TAGTATTAC (PCV1) ou AAGTATTAC (PCV2). Cette structure et ce motif peuvent représenter une origine possible de réplication en cercle-roulant (Mankertz *et al.*, 1998).

L'analyse phylogénique des isolats de PCV1 et PCV2 montre une homologie entre ces isolats. Deux groupes principaux sont à noter : un comprenant le groupe du PCV1 et l'autre celui du PCV2. Mais ces deux virus sont distincts. Le groupe du PCV2 semble divisé en plusieurs sous-groupes selon la région d'origine des isolats viraux (Jestin *et al.*, 2001).

Quatorze séquences d'acides nucléiques du génome complet de plusieurs isolats de PCV2 ont été étudiées à partir des données Genbank. Ces souches ont été isolées durant la dernière décennie et ont été comparées grâce à un programme (Clustal W) après alignement. La comparaison des séquences génomiques ne montre aucune zone de délétion, insertion ou aires étendues de substitutions nucléotidiques. Les seuls changements sont des mutations ponctuelles. Le dendrogramme basé sur l'homologie montre deux principaux groupes : les souches nord-américaines et des souches hétérogènes de différentes zones géographiques (Brunet et Charreyre, 2000).

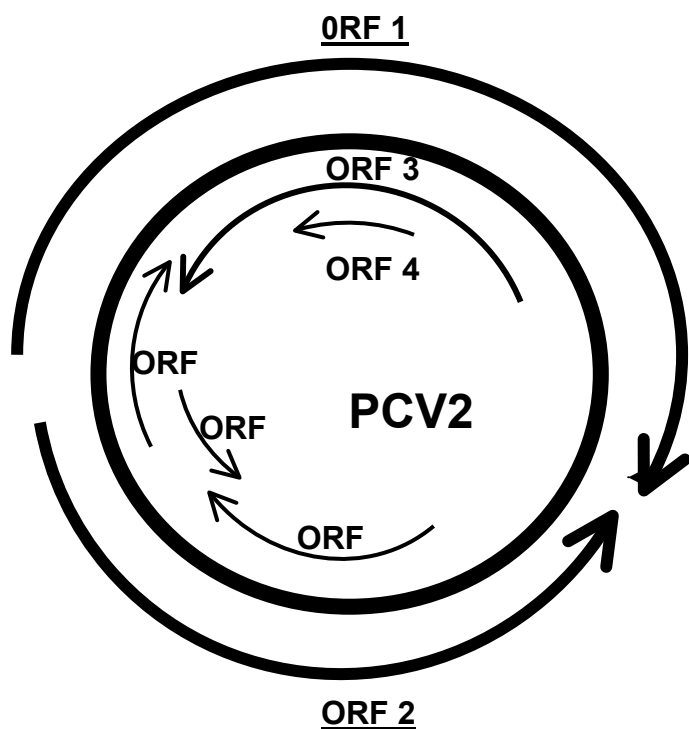


Figure 9: représentation schématique du génome du PCV2. Les deux principaux ORF (1 et 2) sont mentionnés en gras et soulignés. D'après Morozov *et al.*, 1998.

## **2-5 Variabilité génomique**

Une étude transversale par comparaison du génome de PCV2 entre des isolats issus d'élevages atteints de MAP et d'élevages indemnes de MAP a été réalisée (Jestin *et al.*, 2002). Les génomes de 19 PCV2 provenant d'élevages MAP+ et de 19 PCV2 d'élevages MAP- ont été entièrement séquencés. La comparaison des séquences entre elles a révélé une similarité nucléotidique élevée (99,5 à 100%) entre les isolats récoltés dans les élevages MAP+ et légèrement plus faible (96,5 à 100%) entre les isolats issus d'élevage MAP-, ce qui témoignerait d'une hétérogénéité génomique plus importante pour les PCV2 isolés dans les élevages sans signes cliniques et sans antécédents de MAP (Jestin *et al.*, 2002). Les mutations identifiées sont réparties sur tout le génome mais sont davantage concentrées sur l'ORF 2 que sur ORF 1. Cette étude apporte de nouvelles informations concernant la stabilité des séquences génomiques de PCV2 et l'originalité des virus isolés en France car ils forment un groupe original par rapport aux autres virus présents dans les banques de données. En revanche, cela n'a pas permis pour l'instant de caractériser un facteur associé à la virulence du virus. Une deuxième voie de recherche concerne l'étude de l'évolution des groupes PCV2

dans le temps mais les données sont encore fragmentaires et toujours à l'étude (Jestin *et al.*, 2002).

## **2-6 Propriétés physico-chimiques du circovirus**

Les circovirus sont très résistants et stables dans l'environnement. Les circovirus, comme les parvovirus, sont des petits virus à ADN simple brin, non enveloppés, leur conférant une grande stabilité et résistance à de nombreux agents chimiques, notamment l'hypochlorite de sodium, le formol et la chlorhexidine. D'autres désinfectants contenant des phénols, des ammoniums quaternaires, de l'hydroxyde de sodium ou des agents oxydants sont capables de diminuer le titre en PCV2 quand ils sont testés *in vitro* (Royer *et al.*, 2001).

Aucune activité d'hémagglutination à différentes températures (4°C, 22°C, 37°C) n'a pu être détectée avec les circovirus. Il faut noter également la résistance de ces virus à l'inactivation à pH 3 et au chloroforme et la stabilité de ceux-ci à 56°C et 70°C pendant 15 minutes (Allan *et al.*, 1994).

## **2-7 Détection du circovirus porcin de type 2**

### **2-7-1 Détection de l'agent viral**

#### **2-7-1-1 Hybridation *in situ***

L'hybridation *in situ* (HIS) est une méthode de détection d'une partie de l'ADN du circovirus porcin de type 2 (PCV 2), directement sur une coupe d'organe. Pour cela, on réalise des coupes sur des organes, prélevés lors d'autopsie, fixés au formol à 10 % et inclus en paraffine. Une sonde spécifique (un brin d'ADN complémentaire d'une portion du génome du PCV 2) doublement marquée à la digoxigénine est placée au contact de la coupe d'organe (Gambade *et al.*, 2000). Ce simple brin marqué s'associe avec sa séquence complémentaire : si le tissu analysé contient du virus, donc de l'ADN viral, la sonde se fixe et après rinçage, il reste une coloration intracellulaire marquant la présence du PCV 2 (document ITP, 2001).



Cependant pour cette méthode, il faut mettre au point une sonde nucléique reconnaissant exclusivement le circovirus porcin de type 2 et permettant la différenciation avec le circovirus porcin de type 1. Des sondes sens et antisens des gènes des protéines ORF 1 et ORF 2 du PCV 2 ont été fabriquées (Nawagitgul *et al.*, 2000). La sonde antisens ORF 1 s'hybride avec le génome de PCV 1 et PCV 2. Les sondes sens ORF 1 et ORF 2 ne se lient qu'au génome de PCV 2. La sonde antisens ORF 2 ne s'hybride qu'avec le génome de PCV 2 et permet donc de différencier PCV 1 et PCV 2 (Nawagitgul *et al.*, 2000).

Le génome viral peut être détecté dans les tissus lymphoïdes (nœuds lymphatiques, amygdales, plaques de Peyer), surtout dans les follicules mais aussi dans le poumon, les glandes salivaires, le foie, la rate, l'iléon et dans toutes les cellules cibles telles les macrophages, histiocytes et cellules géantes (Balasch *et al.*, 1999).

Cette méthode est fiable sur les cadavres et les animaux sacrifiés. Cependant il faut souligner que plus la mort est tardive, moins le signal est fort donc l'intensité de la réponse diminue dans le temps, d'où l'importance d'un prélèvement post-mortem rapide (Gambade *et al.*, 2000).

#### 2-7-1-2 L'immunohistochimie

Cette méthode permet également de détecter la présence d'un antigène viral, à partir d'une lame histologique venant de coupe d'organes. On utilise alors des anticorps produits par des lapins immunisés avec le PCV2. Les couples antigènes – anticorps spécifiques sont révélés à l'aide d'autres anticorps, reconnaissant ceux du lapin et marqués à la peroxydase (Kennedy *et al.*, 2000).

Lors de MAP, on détecte par immunohistochimie du PCV 2 dans le cytoplasme et le noyau des cellules des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes. Ces antigènes sont également visualisés dans les cellules histiocytaires, les cellules géantes multinuclées du thymus, des nœuds lymphatiques, dans le cytoplasme des macrophages des plaques de Peyer.

On peut trouver des antigènes du PCV 2 dans les hépatocytes intacts ou dégénérés, les débris cellulaires nécrotiques du foie et les cellules de Küpffer. De même, dans d'autres tissus non lymphoïdes tels que les poumons, reins, cerveau et testicules, des antigènes sont mis en évidence dans les macrophages, les cellules épithéliales (Kennedy *et al.*, 2000).

### 2-7-1-3 La PCR (polymerase chain reaction)

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une technique de biologie moléculaire (amplification génique) permettant de mettre en évidence la présence de l'acide nucléique d'un agent infectieux dans un prélèvement (Watson *et al.*, 1994).

Cette méthode utilise un artifice technique qui consiste à multiplier exponentiellement, grâce à une ADN polymérase, les séquences nucléotidiques recherchées au niveau d'un prélèvement. La réaction est une suite de cycles qui amplifient spécifiquement l'ADN recherché. Le principe de cette méthode est fondé sur le fonctionnement de l'ADN polymérase et fait appel à une matrice d'ADN (contenant le fragment recherché), des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) et des amorces. Ce mélange sert de base pour l'amplification et les étapes sont les suivantes :

- Dénaturation de l'ADN matrice double brin, à 94°C en général. A cette température, les liaisons hydrogènes stabilisant la double hélice sont rompues, ce qui empêche d'une part la présence d'ADN double brin, mais aussi l'hybridation des amorces sur chacun des brins simples obtenus.
- Hybridation des amorces spécifiques: les amorces sont des nucléotides complémentaires (à peu près 20 nucléotides) d'une région du génome recherché. Chaque amorce possède une température spécifique (appelée melting température ou  $T_m$ ), ce qui permet leur hybridation au niveau de la séquence à amplifier.
- Elongation : elle se fait dans le sens 5'-3' grâce à la Taq polymérase thermorésistante, à une température optimale de fonctionnement pour cette enzyme (72°C).

La figure 10 résume les différentes étapes de la PCR.

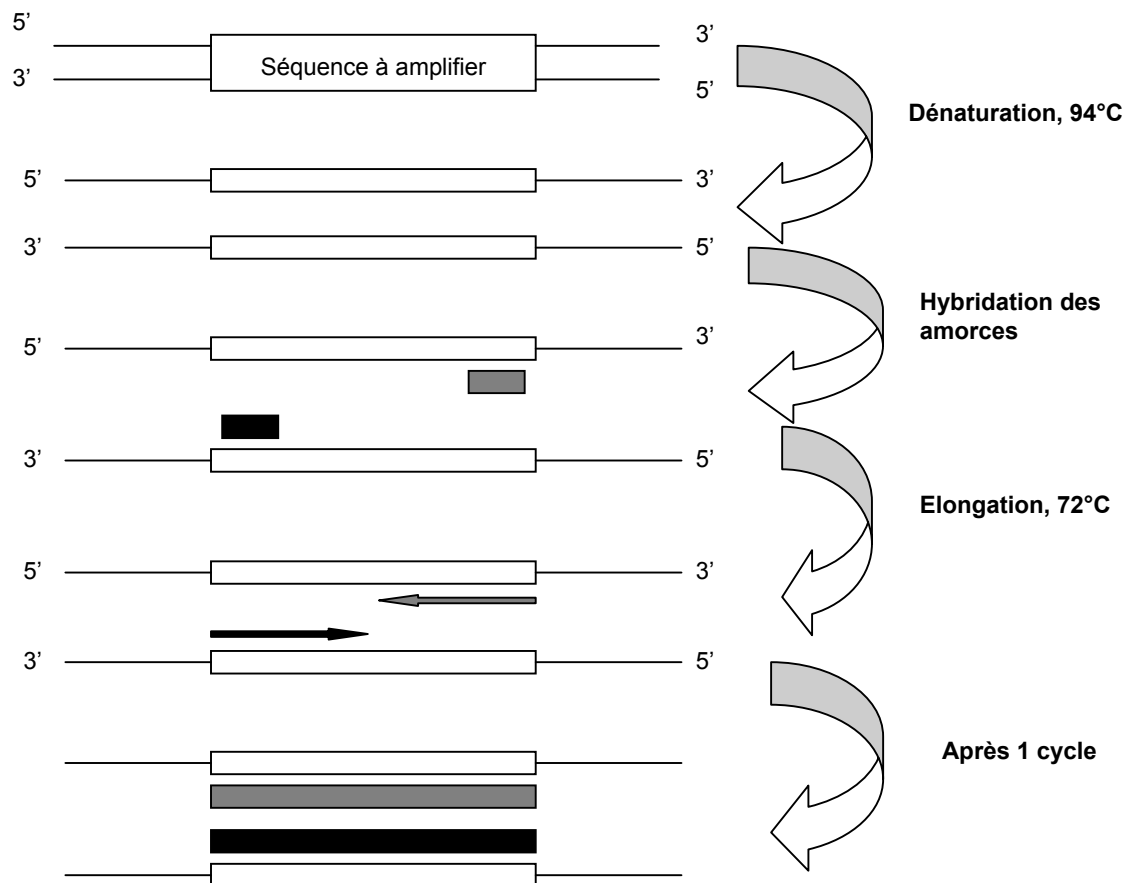


Figure 10 : Etapes d'un cycle de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). A 94°C, les deux brins se séparent. En diminuant la température, on autorise l'hybridation des amorces spécifiques de la séquence à amplifier. L'élongation permet la synthèse de la séquence. Les 2 doubles brins obtenus sont à nouveau séparés à 94°C, pour suivre le même cycle.

La répétition du cycle amplifie de manière exponentielle la séquence recherchée. Au bout de  $n$  cycles, on obtient  $2^n$  copies. Le résultat de l'amplification est analysé par électrophorèse en gel d'agarose. Le gel est ensuite déposé dans un bain de bromure d'éthidium et il est révélé sous rayons ultraviolets grâce à un transilluminateur (Watson *et al.*, 1994).

Dans la littérature, plusieurs PCR ont été décrites pour la détection du PCV2 avec des amorces différentes. Quintana *et al.* (2001) a utilisé trois amorces pour amplifier les deux circovirus porcins (types 1 et 2). L'amorce p4 était spécifique du PCV1, l'amorce p8 était commune aux deux virus et l'amorce p16 spécifique du PCV2. En utilisant le couple p4/p8, il a obtenu un fragment de longueur 194 paires de bases et avec le couple p8/p16 un fragment de 404 paires de bases. La PCR a été utilisée sur sérum et sur des nœuds lymphatiques inguinaux superficiels sur des animaux à différents stades de la maladie et sur des animaux cliniquement

sains. Il a mis en évidence la présence de PCV2 dans quasiment tous les prélèvements, que ce soit le sérum ou les organes. Harms *et al.* (2001) a utilisé deux amorces spécifiques du PCV2 et a obtenu un fragment de 702 paires de bases contenant ORF2. Cette PCR a été testée sur des sérums de porcs de 3 semaines, issus de césarienne et privés de colostrum, et inoculés avec du PCV2. La présence du virus a été détectée à partir du septième jour après inoculation. Enfin, Larochelle *et al.* (2000) ont effectué une PCR nichée avec l'emploi d'amorces externes qui amplifient à la fois le PCV1 et le PCV2 puis des amorces internes n'amplifiant que le PCV2 avec un fragment de 263 nucléotides contenant ORF 2. Cette PCR a été pratiquée sur du sérum et de la semence de verrats après inoculation intranasale. La présence de PCV2 dans la semence a ainsi pu être mise en évidence entre 3 et 13 jours après inoculation.

L'extraction de l'ADN peut se faire à partir de nœuds lymphatiques inguinaux superficiels (Sarli *et al.*, 2001 ; Quintana *et al.*, 2001), de sérum (Quintana *et al.*, 2001), d'urine (Harms *et al.*, 2001) de semence de verroat (Larochelle *et al.*, 2000), de fécès (Charreyre *et al.*, 2000) ou de suspensions d'organes homogénéisés : rate, foie, amygdales, iléon,...(Wellenberg *et al.*, 2000) en utilisant un kit commercial et en suivant les instructions du fabricant (Qiagen<sup>nd</sup>).

La PCR est une technique très sensible et très spécifique. Cependant le PCV 2 est très résistant dans le milieu extérieur et les risques de contaminations croisées lors des prélèvements au cours des autopsies sont importants. La PCR ne permet de détecter qu'une partie du génome. Un résultat positif indique qu'il y a de l'ADN du PCV 2 dans le prélèvement mais rien ne permet de dire si l'ADN est seulement le reste de la dégradation du virus suite à une défense de l'organisme ou s'il fait partie d'une particule virale infectieuse (Allan et Ellis, 2000).

#### 2-7-1-4 Immuno-Peroxydase Monolayer Assay (IPMA)

Cette méthode peut également permettre la mise en évidence d'anticorps spécifiques mais c'est avant tout une méthode de recherche du virus. Il est détecté grâce à une réaction antigène-anticorps après inoculation d'une culture cellulaire avec un homogénat de foie, noeuds lymphatiques, et autres prélèvements (Krakowka *et al.*, 2001).

#### 2-7-1-5 Isolement viral

L'isolement viral est réalisé à partir d'extraits de tissus (amygdale, rate, nœuds lymphatiques, poumon, foie et iléon). Pour cela, des lignées de cellules de reins de porcs (PK-15), exemptes de circovirus porcin de type 1 sont utilisées. La présence de virus dans les cellules est mise en évidence par immunofluorescence en utilisant des anticorps polyclonaux de porcs dirigés contre le PCV2. L'échantillon est considéré comme négatif si aucun signe de réplication virale était détecté dans les cellules après deux passages en aveugle (Pogranichniy *et al.*, 2002 ; Allan et Ellis, 2000).

La réplication des circovirus *in vitro* est le mieux permise par inoculation sur des monocouches de cellules semi-confluentes de reins de porcs (PK-15). D'autres cultures cellulaires ont été testées comme les macrophages alvéolaires, les cellules mononuclées du sang périphérique ou encore, les lignées cellulaires de reins de singes. Ces cultures de cellules ont été vérifiées tous les jours pour voir un éventuel effet cytopathique et après 7 jours, une IPMA a été réalisée. Mais aucun effet cytopathique n'a pu être mis en évidence (Albina *et al.*, 2001 ; Johnson *et al.*, 2002).

#### 2-7-2 détection des anticorps anti-PCV2

L'analyse sérologique correspond à la recherche d'anticorps spécifiquement dirigés contre un agent infectieux. Les scientifiques se sont heurtés à une première difficulté : la spécificité des techniques permettant de différencier les deux circovirus. Une seconde difficulté apparaît également : la sensibilité des tests.

##### 2-7-2-1 L'immunofluorescence indirecte

Cette méthode repose sur la mise en évidence de la réaction antigène-anticorps par un marqueur fluorochrome. Le matériel consiste en des cellules infectées par le PCV2 et fixées sur une lame. Plusieurs dilutions des sérums à tester sont déposées sur des préparations de cellules infectées. On réalise un lavage pour éliminer les anticorps non fixés et on ajoute des anticorps anti-immunoglobulines de porcs marqués par un fluorochrome. On effectue un nouveau lavage et on observe en microscopie à fluorescence (Walker *et al.*, 2000).

Il existe une très bonne concordance entre l'immunofluorescence indirecte et l'immunohistochimie et d'un point de vue pratique, l'utilisation de l'immunofluorescence est une méthode plutôt sensible, simple, peu coûteuse et performante (Alborali *et al.*, 2001). Cependant, il faut être vigilant face à l'interprétation des résultats à cause d'un certain degré de réaction croisée entre les deux circovirus (Allan et Ellis, 2000).

#### 2-7-2-2 Méthode ELISA (Enzyme Like ImmunoSorbent Assay)

Un premier test ELISA utilisant un fragment de protéine du PCV2 obtenu par biochimie a été mis au point. Cette technique très spécifique souffre d'un manque de sensibilité (document ITP, 2001).

Un test ELISA de seconde génération très performant a été développé, utilisant une protéine virale ORF 2) obtenue par biotechnologie (recombinaison en baculovirus ; Jestin *et al.*, 2002). Il est très spécifique et très sensible. Il était notamment utilisé pour les contrôles des verrats en centre d'insémination artificielle sur sérum (Pozzi *et al.*, 2001).

Une méthode ELISA-compétition a été également créée pour la détection d'anticorps sériques contre PCV2. L'essai a utilisé un isolat de culture cellulaire de circovirus porcin de type 2 comme antigène et un anticorps monoclonal spécifique du PCV2 comme compétiteur. Il s'est avéré que cette technique était plus sensible et plus spécifique que l'immunofluorescence indirecte lors de cette étude en comparant les deux méthodes (Walker *et al.*, 2000).

### **3– Modifications de la distribution des populations leucocytaires et immunité humorale lors de l'infection par le PCV2**

#### **3-1 Immunité chez le porc**

L'espèce porcine représente un modèle d'étude du développement de la compétence immune du fœtus en l'absence d'anticorps ou de stimulation antigénique d'origine maternelle. En effet, le placenta épithélio-chorial comporte 7 couches histologiques, constituant autant de barrières entre les réseaux sanguins maternel et fœtal (Salmon *et al.*, 1990).

Dépourvu d'anticorps maternels mais immunocompétent, le porcelet nouveau-né, dans les conditions d'élevage conventionnel, est brusquement mis au contact d'un grand nombre de déterminants antigéniques, provoquant l'apparition d'immunoglobulines IgM et l'augmentation du nombre de cellules immunologiquement compétentes et à mémoire (Salmon *et al.*, 1990).

Dans les conditions naturelles, le nouveau-né reçoit de sa mère, par le colostrum et le lait, une protection efficace (effet protecteur des anticorps maternels). Le colostrum est enrichi en IgG et IgM par rapport au plasma. En revanche, les IgA, immunoglobulines prédominantes du lait, proviennent indirectement du système immunitaire de l'intestin. Ainsi, le niveau de l'immunité transmis par le colostrum dépend étroitement de l'état d'immunisation systémique de la mère, tandis que celle transmise par le lait dépend de son état d'immunisation intestinale (Salmon *et al.*, 1990).

Chez les porcelets nouveaux-nés, les globules blancs sont constitués d'environ 60 % de neutrophiles et 38 % de lymphocytes. Ce taux s'inverse 10 jours après la naissance. Les monocytes circulant des porcelets nouveaux-nés sont immatures, cette faible activité persiste durant la première semaine de la vie (Pastoret *et al.*, 1998).

L'immunité spécifique est assurée par les cellules de la lignée lymphoïde en collaboration étroite avec les cellules phagocytaires (monocytes et macrophages). Les cellules lymphoïdes sont hétérogènes, réparties en de multiples sous-populations ayant des fonctions distinctes. Il convient de faire la part entre les lymphocytes B qui produisent les anticorps et les cellules T qui assurent l'immunité à médiation cellulaire et jouent un rôle crucial dans l'immunorégulation (Bach, 1990). Les lymphocytes T caractérisés par l'antigène CD3 ne présentent pas d'immunoglobulines de membranes, et comprennent pour 90 % des lymphocytes T CD4 et CD8 et pour 10 % des lymphocytes dénués des antigènes CD4 et

CD8. Les lymphocytes T CD4 sont des lymphocytes T auxiliaires alors que les lymphocytes T CD8 sont cytotoxiques. A la différence de l'homme et de la souris, les lymphocytes CD8+ prédominent en nombre sur les CD4+ dans la majorité des organes et on observe une proportion non négligeable (10-15 %) de cellules doublement marquées CD4+CD8+ dont la fonction est encore inconnue (Salmon *et al.*, 1990).

### **3-2 Modifications de la distribution des populations leucocytaires lors de MAP**

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant l'évolution et la distribution des paramètres leucocytaires chez des porcelets atteints de MAP. Toutefois, il est à noter une augmentation significative des granulocytes et surtout une baisse marquée du nombre de lymphocytes CD3+, CD4+ (marqueurs des lymphocytes T helpers) alors que le nombre de lymphocytes T CD8+ reste à peu près stable (marqueurs des lymphocytes T cytotoxiques) chez des animaux atteints de MAP. Le rapport CD4+/CD8+ chez les porcelets malades est inférieur (0.31) à celui des animaux sains (0.64). Le nombre de lymphocytes B identifiés par l'expression d'IgM de surface est en baisse. Les monocytes identifiés par Swc3 augmentent (Ségalet *et al.*, 2001).

De plus les animaux atteints de MAP ont un pourcentage plus important de lymphocytes T CD14+, marqueurs des monocytes et granulocytes (Martelli *et al.*, 2001).

On note donc chez les animaux atteints de MAP une tendance à l'anémie, une inversion de la formule sanguine avec une nette lymphopénie (chute des lymphocytes T CD4, et B) et une augmentation des granulocytes, monocytes. Ces résultats suggèrent que les porcelets infectés présentent une incapacité à développer une réponse immunitaire efficace.

### **3-3 Suivi de l'immunité humorale lors de l'infection par le PCV2**

Différentes études sérologiques ont été réalisées afin de suivre la cinétique des anticorps anti-PCV2 dans les élevages sains et atteints de MAP.

Une étude sérologique comparative de porcs de 7 troupeaux du Québec avec (5 élevages) et sans (2 élevages) MAP a été réalisée (Laroche *et al.*, 2003). Pour chaque élevage, des sérums ont été prélevés à 4 semaines d'intervalle de porcs âgés de 3 à 23 semaines. Les



profils sérologiques (immunofluorescence indirecte) étaient très similaires dans 6 des 7 élevages incluant les 2 élevages indemnes et étaient caractérisés par une baisse progressive des anticorps de 3 à 11 semaines d'âge, suivi d'une séroconversion à 15 semaines et de hauts titres en anticorps anti-PCV2 par la suite chez tous les porcs. Vers 11 semaines, les porcs sont exposés à l'infection par le virus, comme cela a été démontré par la détection du PCV2 par PCR dans les sérums entre 11 et 15 semaines (Larochelle *et al.*, 2003). La cinétique de la décroissance des titres en anticorps anti-PCV2 suggère que les anticorps présents à 3 semaines d'âge sont vraisemblablement d'origine maternelle (immunité passive).

Une autre étude réalisée sur 250 porcs d'un élevage a montré là encore une diminution des anticorps anti-PCV2 (IPMA) entre 3 et 7 semaines d'âge puis une séroconversion à 12 semaines qui s'est maintenue jusqu'à 28 semaines d'âge (Rodriguez-Arrioja *et al.*, 2002).

## **4- Diagnostic de la maladie d'amaigrissement du porcelet**

D'un point de vue clinique, c'est une maladie déroutante où le dépérissement brutal est le critère essentiel à retenir. L'hypertrophie des nœuds lymphatiques est quasi systématique mais pas toujours facile à mettre en évidence. Les autres signes cliniques peuvent accompagner ce tableau mais ils ne sont pas systématiques. Les investigations post-mortem et histologiques permettront de compléter le tableau clinique en vue de préciser le diagnostic.

L'atteinte des organes lymphoïdes (polyadénomégalie) étant quasi systématique, les lésions pulmonaires (pneumonie interstitielle), hépatiques (hépatomégalie ou atrophie, ictère), rénales (néphrite interstitielle avec de multiples foyers pâles) et digestives (œdème du mésocolon, entérite) souvent présentes, l'examen histologique peut s'avérer intéressant.

Les analyses microscopiques réalisées à partir de coupes d'organes colorées à l'hémalun-éosine venant d'animaux atteints de maladie d'amaigrissement du porcelet montrent des lésions fortement évocatrices de cette pathologie. Ainsi la déplétion lymphocytaire, l'histiocytose et la présence d'inclusions cytoplasmiques et nucléaires orientent fortement le diagnostic (Sorden, 2000).

On voit bien à travers ces différents types de diagnostic que les signes cliniques ne sont pas pathognomoniques. Il y a de nombreuses causes de baisse de performance chez les porcs en croissance.

De plus, les lésions macroscopiques ne sont pas spécifiques à cette pathologie même si elles sont fortement évocatrices ; en effet, on trouve des lésions similaires dans d'autres maladies comme le syndrome respiratoire et reproducteur porcin, la salmonellose septicémique.

Enfin, des lésions macroscopiques causées par des surinfections bactériennes ou autres et des infections virales diverses peuvent modifier les lésions de la maladie d'amaigrissement du porcelet (Sorden, 2000).

Il est donc nécessaire d'avoir un diagnostic de certitude pour confirmer clairement cette pathologie, par exemple en mettant en évidence une séroconversion ou la présence du circovirus porcin de type 2.

Plusieurs méthodes ont été développées pour détecter le PCV2 dans les tissus. L'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie sont les deux méthodes les plus utilisées en routine (Segales et Domingo, 2002).

L'hybridation *in situ* est la méthode de référence pour le diagnostic de la maladie d'amaigrissement du porcelet. Elle peut être automatisée. De plus, avec cette technique, plusieurs organes peuvent être analysés sur une même lame, d'où un moindre coût. La technique est semblable à celle de l'histologie et le choix de la sonde permet d'éviter les réactions croisées avec le circovirus porcin de type 1 éventuellement présent. Cependant, en fin de maladie, l'hybridation *in situ* peut être négative, les follicules lymphoïdes étant anéantis et les inclusions virales n'étant donc plus retrouvées (document ITP, 2001).

Plusieurs techniques sérologiques pour détecter les anticorps anti-PCV2 ont été développées (ELISA, IPMA, immunofluorescence indirecte), mais, de nos jours, aucune n'est utilisée sur des bases commerciales. Le fait que le PCV2 soit largement répandu dans les élevages, qu'ils soient atteints de MAP ou non, marque une limite forte à l'utilisation des techniques sérologiques pour le diagnostic de la maladie (Segales et Domingo, 2002).

## **5- Prévention et traitement de la maladie d'amaigrissement**

Quelques essais de traitements ont été réalisés et seront relatés ici. Des éléments de recherche sur la prévention vaccinale ont été à l'étude.

### **5-1 essais de traitements et contrôle de la MAP**

#### 5-1-1- les vingt mesures de l'AFSSA

Le traitement et le contrôle de la maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP) ont d'abord été ciblés sur les bonnes pratiques d'élevage même si peu d'études ont été entreprises dans ce domaine (Harding, 2001). L'équipe de François Madec de l'Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) a développé une liste de vingt mesures ou recommandations à envisager pour contrôler cette pathologie :

- En maternité
  - Installer un système tout-plein tout-vide et un nettoyage et désinfection entre les bandes
  - Doucher les truies et appliquer un traitement antiparasitaire avant l'entrée en maternité
  - limiter les adoptions à ce qui est réellement nécessaire et dans les 24 heures suivant la mise bas.
- En post-sevrage
  - Se limiter à des petites cases (moins de treize animaux) et une répartition homogène
  - Assurer un vide sanitaire, nettoyage et désinfection, maintien de la politique stricte du système tout-plein tout-vide
  - Avoir une faible densité (moins de trois porcs au mètre carré)
  - augmenter l'espace à la nourriture à plus de sept centimètres par porc
  - améliorer la qualité de l'air ( $\text{NH}_3 < 10\text{ppm}$ ,  $\text{CO}_2 < 1.05\%$ , Humidité  $< 80\%$ ,...)
  - améliorer la température d'ambiance

- ne pas mélanger les bandes
- En engraissement
  - Se limiter à des petites cases et avoir une répartition homogène
  - Maintenir le système du tout-plein tout-vide, nettoyage et désinfection
  - Ne pas mélanger des porcs à l'engrais avec des porcelets de post-sevrage
  - Ne pas mélanger les bandes d'engraissement
  - Avoir une faible densité
  - améliorer la qualité de l'air et la température ambiante
- En plus
  - réaliser un programme de vaccination adapté
  - assurer un débit raisonné à l'intérieur des bâtiments (air et animaux)
  - respecter une hygiène stricte (lors de la coupe de la queue et du limage des dents, pour les injections,...)
  - réaliser un déplacement précoce des porcs malades dans l'infirmerie

Suite à l'application partielle ou totale de ces mesures, les résultats de ces recommandations sur quatre élevages ont montré une forte baisse du taux de mortalité en post-sevrage. Il a été mis en évidence un rôle important de l'environnement dans le développement de cette pathologie mais il a été impossible d'identifier et de peser le rôle précis de ces facteurs (Madec *et al.*, 2001 ; Madec *et al.*, 2002).

#### 5-1-2 essais de traitement

L'emploi d'acétaminophène (Paracétamol®) a été testé. Il a été administré par voie orale une dose de 30 mg/kg de poids vif pendant dix jours consécutifs sans antibiothérapie, à des porcs de 39 jours (une quinzaine de jours après sevrage) issus d'un élevage atteint de manière chronique par la MAP. Le résultat le plus important de cet essai est une réduction légère des taux de morbidité et mortalité chez ces porcelets (Bernard *et al.*, 2001).

De même, un traitement oral avec des suppléments multivitaminés dans l'eau de boisson pourrait avoir un effet bénéfique accompagné d'une minimisation des facteurs de stress (Baird *et al.*, 2000).

Des résultats intéressants ont été obtenus avec l'utilisation de glucocorticoïdes. L'injection de 0.5mg/kg de poids vif de corticoïdes par voie intramusculaire a été réalisée de la façon suivante : 0.2 mg/kg de corticoïdes à action moyenne et 0.3mk/kg de corticoïdes à longue action. Cela apparaît être une méthode utilisable pour traiter des animaux individuellement et réduire à la fois la sévérité des signes cliniques et le nombre de morts durant la phase aiguë de l'épisode de la MAP (Baird *et al.*, 2000).

### 5-1-3 La sérothérapie

Une autre stratégie préventive a été décrite en France: la sérothérapie. Elle consiste à prélever du sang de porcs de cent kilogrammes dans des containers stérilisés, issus d'un élevage atteint. La coagulation se fait à basse température, le sérum est récupéré après clarification et décontamination par filtration. Les porcelets âgés de 33 jours environ reçoivent une injection sous-cutanée de 20 mL de sérum, 7 jours après leur arrivée dans la ferme. Le taux de mortalité a été fortement réduit (de 10 à 15 %) dans cet essai et ce taux s'est maintenu jusqu'à la fin de la période d'engraissement (Ferreira *et al.*, 2001).

Ces résultats sont encourageant mais des précautions strictes sont à prendre : éviter le risque d'introduire d'autres agents pathogènes, respect strict de l'asepsie lors de l'injection, vérifier la température du donneur pour ne pas prendre un animal septicémique, ne jamais utiliser cette technique dans une région où les virus du SDRP et de la maladie d'Aujeszky circulent activement et enfin ne pas prendre de sérum venant d'un abattoir. De même, cette technique pourrait transmettre aussi le PCV2 lui-même. Cette technique est aussi connue pour ne pas être sûre au niveau microbiologique et pourrait se révéler très dangereuse non seulement pour l'élevage mais aussi pour la filière porcine nationale dans son ensemble en cas de fièvre aphteuse ou de peste porcine classique (Ferreira *et al.*, 2001).

En Italie, une méthode de prise de sang a été développée sur des sujets donneurs rendant possible la collecte d'un grand volume de sang (0,5 à 1 litre par sujet) sans recourir à l'abattage de l'animal. Elle consiste à l'emploi d'aiguilles à fistule artérioveineuse servant en médecine humaine lors d'hémodialyse. Cette technique est donc envisageable sur le terrain et évite ainsi le risque de contamination lié à une collecte de sang à l'abattoir. Cette sérothérapie

est une stratégie qui repose, soit sur le transfert d'immunité spécifique pour PCV 2, soit sur une protection aspécifique ou enfin selon certains auteurs sur une sérovaccination (Gherpelli, Martineau, 2002).

### **5-2 Prévention vaccinale**

Aucun vaccin n'est actuellement disponible. Un vaccin recombinant a été développé par l'équipe d'André Jestin de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Il consiste en une recombinaison de gènes ORF 1 et ORF 2 en baculovirus. Les premiers résultats tendent à montrer un niveau élevé de protection contre ORF2 (Jestin *et al.*, 2001).

## **PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE**



# **1- Objectifs**

Le PCV2 est associé à la MAP, mais sa capacité à induire seul la maladie ne paraît pas évidente (Balasch *et al.*, 1999), la présence de certains cofacteurs (SDRP, parvovirus, environnement...) a été impliquée dans l'apparition de la maladie (Allan *et al.*, 1999, 2000). D'autre part, les données actuelles montrent que l'infection par le PCV2 est largement répandue et présente dans la majorité des élevages atteints ou non de MAP (Thomson *et al.*, 2000). De plus, au sein du même élevage atteint, la majorité des porcelets ne présentent aucun signe clinique de MAP alors que les autres sont sévèrement affectés (Madec *et al.*, 2000).

C'est pourquoi les travaux de cette thèse s'inscrivent dans une étude plus générale dont l'objectif principal est le suivant : pourquoi, au sein d'un élevage atteint par la MAP, les signes cliniques de la MAP apparaissent-ils chez certains porcelets et pas les autres ?

Ainsi 3 groupes d'animaux sont suivis longitudinalement et comparés au sein de 2 cohortes : un élevage atteint de MAP et un élevage apparemment sain :

- les porcelets non atteints de MAP dans l'élevage apparemment sain
- les porcelets non atteints de MAP dans l'élevage atteint de MAP
- les porcelets atteints de MAP dans l'élevage atteint de MAP

Cette étude se base sur l'hypothèse que la composante immunitaire de l'hôte joue un rôle dans l'apparition des signes cliniques. En effet, le statut immunitaire de l'animal semble jouer un rôle clef dans l'apparition de la MAP (Allan *et al.*, 2000 ; Krakowka *et al.*, 2001).

Aucune étude sur la MAP, s'intéressant à la fois au PCV2 et à l'hôte, n'avait encore été réalisée de manière longitudinale. Les objectifs de cette thèse étaient donc d'une part de suivre l'infection par le PCV2, et d'autre part, d'évaluer le statut immun de l'hôte lui-même.

Pour cela, nous avons suivi les porcelets d'un élevage atteint de MAP et d'un élevage apparemment sain depuis la naissance jusqu'à 16-18 semaines d'âge. Une nouvelle PCR nichée a été développée et l'infection par le PCV2 a été suivie sur sérum à l'aide de ce test PCR et d'un nouveau test ELISA commercial sur matières fécales (en cours de validation). Le statut immunitaire de l'hôte a été évalué par le suivi des différents paramètres hématologiques (numération et formule sanguine) et la distribution des leucocytes a été étudiée par cytométrie en flux.

## 2- Matériel et méthodes

### 2-1 Elevages et échantillons de porcelets

Lors de cette étude, deux élevages ont été suivis (tableau 1) : un élevage témoin (élevage A), non atteint de MAP, et un élevage atteint (élevage B). Dans chaque élevage, et pour une bande donnée, les porcelets sont suivis depuis la naissance jusqu'à 17-18 semaines d'âge. Il a été choisi de n'inclure que des élevages naisseurs-engraisseurs, afin d'éviter tout facteur de risque supplémentaire et surtout de contrôler pré et post-sevrage. Tous les porcelets suivis ont été tirés au sort à l'aide d'une table des nombres aléatoires, lors des naissances et identifiés par marquage auriculaire (boucles Chevillot). Dans chaque élevage, 12 truies ont été sélectionnées au hasard des mises bas. Pour chaque truie, entre 3 et 6 porcelets ont subi un tirage aléatoire sur le numéro de rang de portée.

L'élevage B atteint de MAP (MAP+) connaît des problèmes de MAP depuis au moins trois ans. La MAP clinique aigüe a été diagnostiquée par hybridation *in situ* dans les 3 ans qui précèdent l'étude. Lors de cette étude, cet élevage présentait des problèmes de MAP de type enzootique avec des cas cependant moins nombreux.

Tableau 1. Caractéristiques des élevages suivis.

Elevage	Statut	Région	Département	Nombre de truies	Nombre de truies par bandes	Nombre de porcelets *	Début et fin de suivi
A	MAP-	Midi- Pyrénées	Aveyron	140	20	36	Octobre 2002 à janvier 2003
B	MAP+	Aquitaine	Pyrénées Atlantiques	300	40-45	60	Mars 2003 à fin juillet 2003

\* porcelets tirés au sort et identifiés à la naissance

## **2-2 Prélèvements**

### **2-2-1 Prélèvements d'échantillons sanguins et de matières fécales**

Des prélèvements d'échantillons sanguins et de matières fécales ont été réalisés de manière régulière, depuis la naissance jusqu'à 16-18 semaines d'âge (tableau 2). Les prises de sang ont été réalisées au niveau du sillon du golfe de la veine jugulaire à droite, sur l'animal couché sur le dos jusqu'à 10 semaines d'âge et debout au-delà de 10 semaines d'âge (l'animal étant contenu à l'aide d'un lasso).

Tableau 2. Organisation des prélèvements d'échantillons sanguins et de matières fécales

<b>Age</b>	<b>Prises de sang</b>			<u>Matières fécales</u>
	Tube sec	Tube héparine	Tube EDTA	
Naissance	cordon	-	-	-
1 <sup>ère</sup> semaine	-	-	-	X
3 semaines	X	X	X	X
Vers 10 semaines	X	X	X	X
16-18 semaines	X	X	X	X

Le sang récolté sur tube sec (ou à partir du cordon ombilical) est, après coagulation, centrifugé à 2500 tours par minute pendant 25 minutes pour récupérer le sérum. Les échantillons de sérum ont été aliquotés (2 à 3 aliquots par porc, soit environ 1 à 2 mL de sérum par porc) et conservés à – 20°C.

Le sang récolté sous EDTA, destiné à la numération et l'établissement de la formule sanguine, a été traité directement le jour même.

Les échantillons sanguins sous héparine étaient destinés à récolter les leucocytes et sont également traités le jour même.

Les écouvillons rectaux ont été réalisés en double de manière à conserver la moitié à -20°C pour des analyses ELISA et l'autre moitié à –80°C éventuellement pour une autre analyse ultérieure, tel que la PCR.

Un prélèvement de matières fécales et un prélèvement sanguin sur tube sec ont été également réalisés sur les truies des porcelets identifiés, afin de déterminer leur statut sérologique et la présence de PCV2 dans les matières fécales et le sérum.

### 2-2-2 Suivi et questionnaire

Une attention particulière a été demandée aux éleveurs pour le suivi des porcelets de chaque cohorte considérée. Tous les événements (changements de logements, allotements, modifications de l'environnement, vaccinations, signes cliniques, traitements médicaux, mortalités, travaux, ...) sont notés dans un livre de bord par élevage (type agenda), relevé à la fin de l'étude. Il y est également noté les visites réalisées et les contrôles effectués.

### 2-2-3 Détection des anticorps anti-PCV2 dans les fécès

La présence d'anticorps anti-PCV2 est mise en évidence à partir des échantillons de fécès à l'aide d'un ELISA de blocage. Cet ELISA, non encore commercialisé, est encore en cours de validation par Synbiotics Europe.

Ce test utilise une technique immuno-enzymatique par blocage (figure 11) permettant la détection des anticorps anti-PCV2 dans les fécès de porcs. La réaction comporte les étapes suivantes :

- les témoins négatif et positif du coffret ELISA et les échantillons à tester sont distribués dans une cupule sensibilisée avec des anticorps anti-PCV2 sur lesquels est fixé l'antigène PCV2 et mis à incuber à 37°C pendant une heure. Les anticorps anti-PCV2 éventuellement présents dans l'échantillon fécal de porc se lient spécifiquement à l'antigène.
- quatre lavages sont réalisés afin d'éliminer tous les anticorps non fixés
- un conjugué spécifique (anticorps monoclonal) de l'antigène PCV2 marqué à la peroxydase est ajouté. Il se fixe sur les sites restés libres.
- quatre lavages sont réalisés afin d'éliminer tous les anticorps marqués à la peroxydase qui ne se sont pas fixés spécifiquement.
- la réaction spécifique anticorps du conjugué marqué à la peroxydase et antigène est révélée par addition du substrat de l'enzyme qu'elle transforme en produit coloré.

- Les densités optiques sont ensuite mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre en mode bichromatique à 450 et 630 nm.

Ainsi, si il y a présence d'anticorps anti-PCV2, ils se fixent sur l'antigène. L'anticorps du conjugué (également spécifique de l'antigène) marqué à la peroxydase ne peut alors plus se fixer sur l'antigène et est éliminé après lavages. L'enzyme ayant été éliminée, il n'y aura pas de coloration du substrat, l'échantillon est positif.

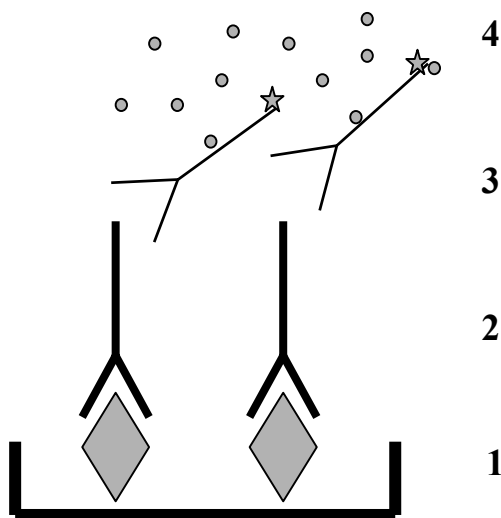


Figure 11 : principe du test ELISA de blocage. 1 : cupule sensibilisée avec l'antigène. 2 : rajout du sérum à tester (ici l'anticorps recherché est présent). 3 : Anticorps spécifique de l'antigène couplé à la peroxydase. 4 : substrat de l'enzyme.

Les résultats de chaque série sont validés si la moyenne des densités optiques (D.O.) du témoin négatif est supérieure à 0,500 et si la moyenne des D.O. du témoin positif est inférieure à 0,300.

Les densités optiques enregistrées sont interprétées en fonction de valeurs seuils calculées à partir des valeurs en D.O. des témoins.

La méthode de calcul et d'interprétation se fait par la mesure, pour chaque échantillon, du ratio : moyenne des D.O. de l'échantillon sur la moyenne des D.O. du témoin négatif.

Tout échantillon présentant un ratio inférieur ou égal à 0,63 est considéré comme positif pour la présence d'anticorps dans les matières fécales. Tout échantillon présentant un ratio supérieur ou égal à 0,75 est considéré comme négatif pour la présence d'anticorps dans les fécès ; entre les deux, l'échantillon est considéré comme douteux (selon les recommandations du fabricant).

#### 2-2-4 Numération et formule sanguine

Les numération et formule sanguine ont été réalisées à partir du sang prélevé sur tube EDTA, à l'aide d'un automate (MS9, Melet Schloesing) réglé sur les paramètres de l'espèce porcine. Il est très important de bien homogénéiser le tube avant de le passer dans l'appareil, en le retournant une quarantaine de fois. L'appareil fournit différents paramètres comme le nombre de globules blancs et parmi ceux-ci les pourcentages de lymphocytes, monocytes et granulocytes, le nombre de globules rouges, le volume globulaire moyen (VGM), l'hématocrite, le taux corpusculaire moyen en hémoglobine (TCMH), la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), le taux d'hémoglobine et le nombre de plaquettes.

#### 2-2-5 Distribution des populations leucocytaires sanguines

Un protocole de séparation des cellules au Ficoll Paque Plus (Amersham-Bioscience) permet d'extraire les cellules sanguines mononuclées périphériques (Joling *et al.*, 1984 ; Ségalès *et al.*, 2001) et de les congeler à -80°C puis ensuite de les conserver dans l'azote liquide. Pour chaque porc, 3 cryotubes sont ainsi conservés dans l'azote liquide. Le sang recueilli lors des prises de sang sur tube héparine est dilué à moitié dans du phosphate-buffered-saline (PBS, Eurobio). Ce mélange est ensuite déposé délicatement sur du Ficoll Paque Plus. Une centrifugation à 2500 tours par minute pendant 25 minutes, décélération minimale, est effectuée. L'anneau de cellules blanches est alors récupéré et lavé deux fois dans du PBS. Les cellules sont resuspendues dans du sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco) avec 10% de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO, Sigma) puis congelées. Pour cela, trois cryotubes par porc sont remplis et mis dans des boîtes de congélation (avec de l'alcool isopropylique) à -80°C. La température descend alors de 1°C par minute.

Afin de séparer les différentes populations lymphocytaires (lymphocytes B, lymphocytes T CD4+, CD8+), les monocytes et les cellules Natural Killer (NK), des marquages ont été réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux. Les cellules marquées ont été triées par cytométrie en flux (FACS). Les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés :

- anticorps monoclonaux « mouse Anti-Pig CD4a FITC » (Clinisciences) concentré à 0,5 mg/mL et dilué au 1/500

- anticorps monoclonaux « mouse Anti-Pig CD8a R-PE » (Clinisciences) concentré à 0,1 mg/mL et utilisé à la dilution 1/500
- anticorps monoclonaux « mouse Anti-Pig CD21 FITC » (Clinisciences) concentré à 0,5 mg/mL et utilisé au 1/500
- anticorps monoclonaux « mouse Anti-Pig Monocyte/Granulocyte R-PE » (Clinisciences) concentré à 0,1 mg/mL et utilisé au 1/500
- anticorps monoclonaux purifiés « mouse Anti-Pig CD16 » (BD Bioscience) concentré à 0,5 mg/mL et utilisé au 1/500. Ces anticorps étant non marqués, il a été utilisé des anticorps monoclonaux anti-souris (fragment d'immunoglobulines Fab2 Goat Anti-Mouse FITC ; Dako) concentré à 1,0 g/L et utilisé au 1/50.

Après décongélation, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS avec 2% de sérum de veau fœtal décomplémenté. Le culot est ensuite remis en suspension. Une numération des cellules a été effectuée au microscope à l'aide d'une cellule de Thoma (on obtient alors un nombre de cellules par mL) et la quantité de mL de suspension à mettre dans chaque tube a été calculée afin d'obtenir 500000 cellules par mL. Une centrifugation à 1000 tours par minute a été réalisée, le surnageant est enlevé puis les anticorps dilués dans du PBS stérile sont mis au contact des cellules et incubés pendant 20 minutes. Ensuite deux lavages sont à nouveau pratiqués avec du PBS. Enfin le culot est suspendu dans du PBS avant la lecture au cytomètre en flux.

Trois types de marquage différents ont été ici réalisés :

- un double marquage CD4 et CD8 pour avoir la numération des lymphocytes T CD4+, CD8+ et les cellules doubles positives CD4+CD8+
- un double marquage CD21 et Granulocytes-monocytes pour la numération des lymphocytes B (CD21+) et des monocytes (les granulocytes ont normalement été éliminés lors de la séparation des cellules au Ficoll)
- un double marquage CD16 (avec anticorps secondaire) et CD8 pour la numération des cellules NK.

## 2-2-6 Détection du PCV2

### 2-2-6-1- développement d'un test de Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### **a. Amorces**

Une nouvelle PCR nichée a été développée pour la détection différentielle de PCV1-PCV2. A partir des différentes souches séquencées (Genebank) du PCV1 et du PCV2, les séquences nucléotidiques ont été alignées au moyen d'un programme d'alignement multiple des séquences (CLUSTAL W). Deux couples d'amorces ont alors été choisis et testés grâce au logiciel OLIGO 4.

#### Première PCR (PCR1)

La première PCR utilise 2 amorces (Invitrogen) spécifiques des deux virus :

- MP1 : 5'- TAGAAGCTCTYTATCGGAGGATTAC-3' (localisé dans le génome du PCV2 en position 862-886 et dans le génome du PCV1 en position 849-873). Le T<sub>m</sub> (melting temperature, température spécifique de chaque amorce) est de 68°C (calculé par la formule approchée  $T_m = 4 \times GC + 2 \times AT$ , GC étant le nombre de nucléotides G et C dans l'amorce, AT étant le nombre de nucléotides A et T dans l'amorce).
- MP2 : 5'- GACCCCGCCCCCGAAGCCAT-3' (position 1682-1700 dans le génome du PCV2 et position 1670-1691 dans le génome du PCV1). Le T<sub>m</sub> est de 70°C.

Cette première PCR amplifie un fragment de 840 paires de bases.

#### Deuxième PCR (PCR2)

La deuxième PCR utilise 2 amorces (Invitrogen) spécifiques du PCV2 :

- MP3 : 5'-CGGATATTGTAKTCCTGGTCGTAT-3' (position 1095-1118 du génome du PCV2). Le T<sub>m</sub> est de 66°C.
- MP4 : 5'-GCCCMATATGTAACTACTCCTCC-3' (position 1298-1321 du génome du PCV2). Le T<sub>m</sub> est de 68°C.

Cette PCR amplifie un fragment de 230 paires de bases.



### **b. Témoins positifs**

La mise au point de cette PCR nichée a été réalisée à partir de dilutions en série (au 1/10) de la souche PCV2 Stoon, multipliée sur cellules PK15 au 6<sup>ème</sup> passage et présentant un titre de  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL (TCID<sub>50</sub> = 50 % Tissue Culture Infective Dose) et d'une lignée de cellules infectées par le PCV1 et indemne de PCV2 (CCL33 cells). Ces témoins positifs des deux virus ont été aimablement fournis par le Pr. H. Nauwynck (Université de Gand, Belgique).

### **c. Extraction de l'ADN**

L'ADN viral a été extrait à l'aide du DNeasy Tissue Kit (Qiagen), en suivant les instructions fournies par le fabricant (le protocole simplifié est fourni en annexe).

### **d. PCR**

#### PCR1

Trois µL d'ADN viral extrait a été ajouté à un volume total de 50 µL de tampon mix PCR. Le tampon mix PCR est composé de :

- 0,200 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (Q Biogene)
- 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)
- tampon de PCR
- 300 µM de chaque amorce
- 1,5 U de Taq polymerase (Q biogene)
- eau pour compléter à 50 µL.

Dans chaque série de réactions, des témoins positifs (dilution du PCV2 ou PCV1) et des témoins négatifs (eau stérile non infectée par le PCV1 et PCV2) ont été inclus.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur : c'est un appareil automatisé, capable de passer d'une température à une autre et de la maintenir selon un schéma programmé à l'avance. L'appareil utilisé ici est un thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer).

Les cycles sont décrits dans la figure 12.

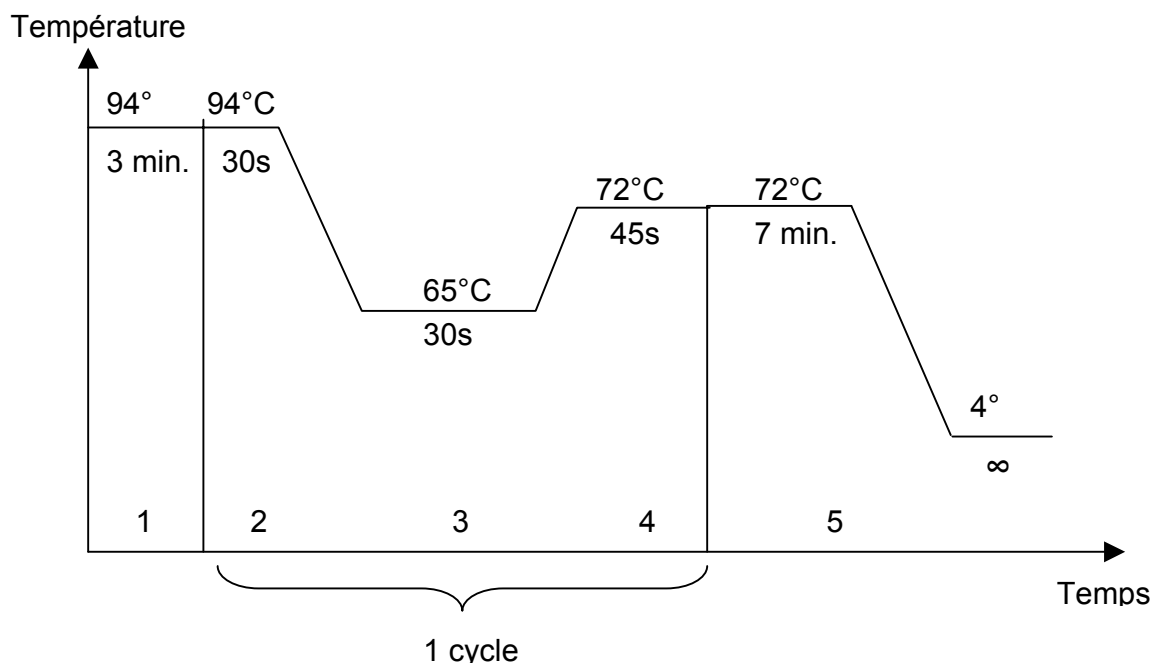


Figure 12 : Description des cycles utilisés pour la détection du PCV1 et du PCV2 par première PCR (PCR1). 1 : séparation des brins, étape préliminaire ; 2 : séparation des brins ; 3 : hybridation ; 4 : élongation. Reprise des étapes 2 à 4, 35 fois. 5 : élongation finale et maintien des échantillons à 4°C.

## PCR2

Les produits d'amplification de la première PCR ont ensuite été dilués au 1/100<sup>e</sup> (5 µL de produit d'amplification dans 495 µL d'eau).

Pour la deuxième PCR, 5 µL de la dilution au 1/100<sup>e</sup> a été ajouté à un volume final de 50 µL de tampon mix PCR. Ce deuxième tampon mix PCR est composé de la manière suivante :

- 0,200 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate
- 1,5 mM de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>)
- tampon de PCR
- 300 µM de chaque amorce
- 1,5 U de Taq polymerase
- eau pour compléter à 50 µL.

Dans chaque série de réactions, des témoins positifs (dilution du PCV2 ou PCV1) et des témoins négatifs (eau stérile) ont été inclus.

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur (GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer)).

Les cycles sont décrits dans la figure 13.

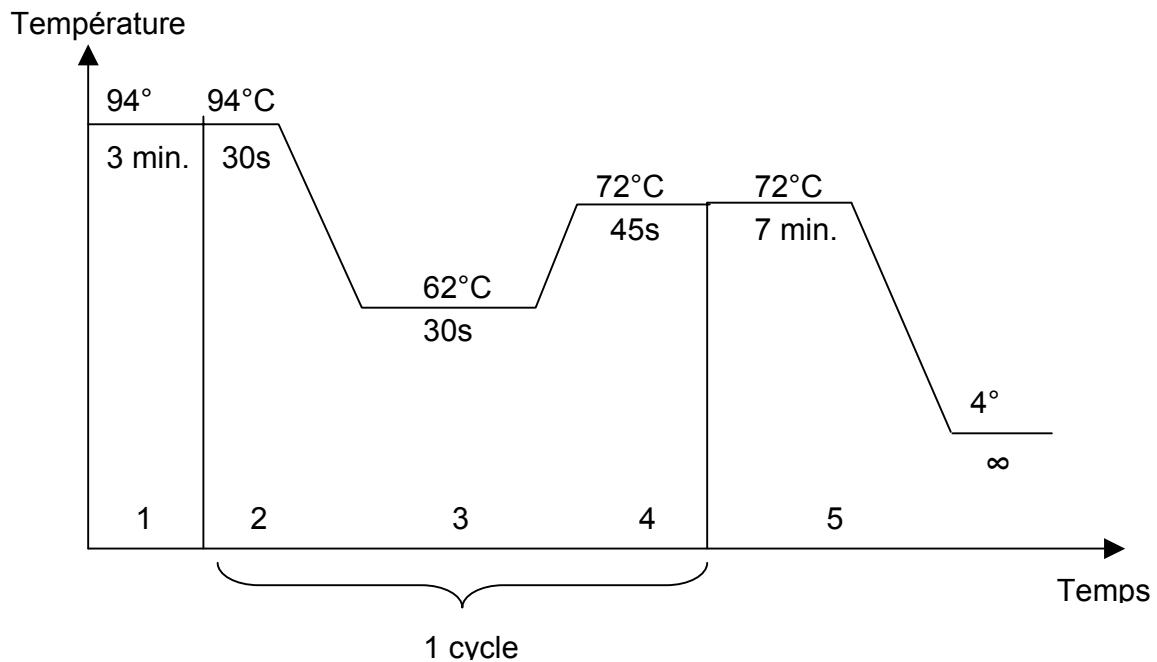


Figure 13: Description des cycles utilisés pour la détection du PCV2 par deuxième PCR (PCR2). 1 : séparation des brins, étape préliminaire ; 2 : séparation des brins ; 3 : hybridation ; 4 : élongation. Reprise des étapes 2 à 4, 30 fois. 5 : élongation finale et maintien des échantillons à 4°C.

#### e. Migration et révélation

Les produits d'amplification de la première PCR ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose (Eurobio) à 1% (tampon Tris Acetate EDTA, Euromedex) et une migration d'une vingtaine de minutes sous un voltage de 120 V a été réalisée. Le gel a été ensuite déposé dans un bain de bromure d'éthidium pendant 5 minutes. La présence de l'ADN viral a été visualisée par la présence d'une bande fluorescente correspondant au poids moléculaire (un kilo bases) du nombre de paires de bases attendues, après lecture sous rayons ultra violets (Transilluminateur Macrovue 2011, associé à un système informatique Appligène de gestion des paramètres de l'image),

Les produits d'amplification de la deuxième PCR ont été déposés dans les puits d'un gel d'agarose (Eurobio) à 2% ( tampon Tris Acetate EDTA, Euromedex) et une migration d'une trentaine de minutes sous un voltage de 120 V a été réalisée. Le gel a été ensuite déposé dans

un bain de bromure d'éthidium pendant 10 minutes. La présence de l'ADN viral a été visualisée par la présence d'une bande fluorescente correspondant au poids moléculaire (un kilo bases) du nombre de paires de bases attendues après lecture sous rayons ultra violets.

Après validation, cette PCR nichée a été testée à partir d'échantillons de sérum.

Après extraction de l'ADN du sérum selon les mêmes modalités (DNeasy Tissue Kit, Qiagen), les cycles d'amplification précédemment décrits et validés pour la PCR1 et la PCR2 ont été réalisés.

#### 2-2-6-2 Test ELISA sur matières fécales

Un test ELISA a été utilisé pour la détection de PCV2 dans les matières fécales de porcs (écouvillons rectaux). Ce test se trouve actuellement en cours de validation (non commercialisé, Synbiotics Europe).

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique monocupule de type « sandwich » (figure 14) permettant la détection d'un antigène PCV2. La réaction comporte les étapes suivantes :

- les témoins positif et négatif du coffret ELISA et les échantillons à tester sont distribués dans les cupules sensibilisées avec des anticorps anti-PCV2 et mis à incuber pendant une heure à 37°C. Les antigènes viraux éventuellement présents dans l'échantillon se fixent sur les sites spécifiques.
- quatre lavages sont réalisés afin d'éliminer tous les antigènes non fixés spécifiquement
- un anticorps anti-PCV2 couplé à la peroxydase (conjugué) est ajouté et permet de révéler la fixation de l'antigène en formant un complexe : anticorps- antigène PCV2- anticorps marqué.
- quatre lavages sont réalisés afin d'éliminer tous les anticorps marqués à la peroxydase non fixés spécifiquement
- l'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré.
- Les densités optiques sont alors mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre en mode bichromatique à 450 et 630 nm.

Ainsi, si dans l'échantillon à tester se trouvent des antigènes PCV2, ceux-ci viennent se fixer sur les anticorps anti-PCV2 fixés au fond de la cupule. L'anticorps anti-PCV2 couplé à la peroxydase se fixe alors à ce complexe. L'ajout du substrat de l'enzyme fait qu'une coloration apparaît, l'échantillon est positif.

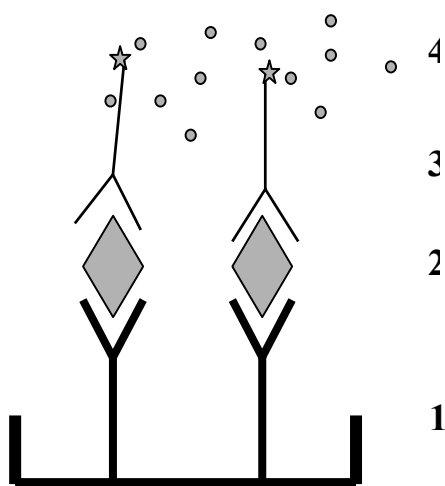


Figure 14 : principe du test ELISA de type « sandwich ». 1 : cupule sensibilisée avec l'anticorps spécifique. 2 : sérum à tester (ici présence d'antigène). 3 : Anticorps spécifique de l'antigène couplé à l'enzyme. 4 : substrat de l'enzyme.

Les résultats de chaque série sont validés si la moyenne des DO du témoin négatif est inférieure à 0,300 et si la moyenne des DO du témoin positif est supérieure à 0,500.

Pour caractériser dans un échantillon la présence ou l'absence de l'antigène PCV2, la méthode du calcul des ratios est utilisée (selon les recommandations du fabricant). Pour chaque échantillon, on calcule le ratio : moyenne des DO de l'échantillon sur la moyenne des DO du témoin négatif. Tout échantillon présentant un ratio supérieur ou égal à 2,17 est considéré comme positif pour la présence d'antigène PCV2 dans les matières fécales. Tout échantillon présentant un ratio inférieur ou égal à 1,78 est considéré comme négatif pour la présence d'antigène PCV2, entre ces deux valeurs, l'échantillon est considéré comme douteux.

#### 2-2-7 Autopsies et analyses anatomopathologiques

Les porcs ont été euthanasiés avec un produit injectable à base d'embutramide, mébézonium et tétracaïne (T 61®, Intervet) selon les indications du fabricant. Une autopsie est ensuite réalisée pour noter toutes les lésions évocatrices ou non de la MAP. Des prélèvements en double sont réalisés : nœuds lymphatiques inguinaux superficiels, mésentériques, trachéobronchiques, rate, plaques de Peyer, poumon et thymus. La moitié de ces prélèvements a été conservée dans du formol 10% pour l'analyse histologique au laboratoire d'anatomie

pathologique de l' Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et l'autre moitié a été conservée à – 80°C en vue d'une éventuelle analyses ultérieure, telle que la PCR.

Quinze porcs ont été autopsiés en tout : 5 dans l'élevage MAP- (A) et 10 dans l'élevage MAP+ (B).

Dans l'élevage A : 2 porcs A1 et A2 (un mâle et une femelle) de 10 semaines et 3 porcs A3, A4, A5 (un mâle et deux femelles) de 18 semaines ont été tirés au sort (à l'aide de la table des nombres aléatoires).

Dans l'élevage B, 10 porcs présentant des signes cliniques pouvant évoquer la MAP ont été autopsiés :

- Quatre porcs B1 à B4 (2 femelles de 87 jours, une femelle de 114 jours et un mâle de 103 jours) ne faisant pas partie des animaux suivis, ni de la même bande.
- Trois porcs B5 à B7 (un mâle de 70 jours, un mâle de 91 jours et une femelle de 98 jours), faisant partie de la bande suivie mais non identifiés à la naissance
- Trois porcs B8 à B10 (une femelle de 91 jours et deux mâles de 17 semaines) ont été autopsiés et faisant partie des porcs suivis depuis la naissance.



### **3- Résultats**

#### **3-1 Elevages**

Dans l'élevage A (MAP-), 36 porcelets ont été suivis jusqu'à 3 semaines puis 27 porcelets étaient encore présents à 10 semaines (quelques pertes de boucles étaient à noter). Enfin un échantillon de 12 porcelets tirés au sort a été suivi à 16 semaines. Dans cet élevage, aucun problème n'a été signalé, les porcelets ont présenté un bon état général tout au long du suivi.

Dans l'élevage B, 60 porcelets ont été suivis jusqu'à l'âge de 10 semaines. Puis un échantillon de 35 porcelets tirés au sort a été suivi entre les semaines 10 et 16.

L'état de santé des animaux était satisfaisant jusqu'à l'âge de 3 semaines. En revanche, à partir de 10 semaines, il a été noté une dégradation de l'état de santé des porcs. En effet, 31 % des porcelets (11 porcelets sur 35) présentaient une nécrose plus ou moins avancée des oreilles et une certaine hétérogénéité dans les cases. Cependant, aucun amaigrissement net n'était présent. Suite à un appel de l'éleveur de l'élevage B où quelques porcs décrochaient, il a été décidé de rajouter une visite supplémentaire entre 10 et 16 semaines. Deux autopsies ont été réalisées à 13 semaines, notamment sur un porc faisant partie des animaux suivis et présentant un amaigrissement marqué avec ligne du dos visible. Un porc suivi n'a pu être autopsié car il est mort le week-end précédant notre visite et l'état de conservation du corps n'a pas permis de réaliser les analyses nécropsiques. Une autre visite eut lieu à 14 semaines. Il a pu être noté une nette régression des nécroses d'oreilles (il restait seulement 6 % des porcs présentant une nécrose d'oreilles). En revanche, un porc suivi présentait un net amaigrissement et fut suivi jusqu'à 16 semaines où il a été autopsié.

Ainsi pour l'élevage B, deux groupes ont pu être constitués. Le groupe B1 correspondant aux porcelets cliniquement sains tout au long du suivi, est constitué d'une trentaine de porcelets suivis depuis la naissance. Le groupe B2, correspondant aux porcelets ayant décroché et présentant les signes cliniques de la MAP, est constitué de 3 porcs (les trois ayant été suivis jusqu'à 10 semaines et un seul jusqu'à 14 et 16 semaines).



### **3-2 Suivi des anticorps anti-PCV2 dans les matières fécales**

Le test ELISA anticorps anti-PCV2 a été réalisé sur tous les échantillons de matières fécales des porcs de l'élevage A (à 1, 3, 10 et 16 semaines), des porcs de l'élevage B (à 1, 3, 10, 14 et 16 semaines), ainsi que sur les truies des deux élevages.

Les résultats montrent la présence d'anticorps anti-PCV2 dans les matières fécales à une semaine d'âge (figure 15). Dans l'élevage MAP- (A), 33 % des porcelets étaient positifs au test ELISA à une semaine et dans l'élevage MAP+ (B1), il y avait 26 % de porcelets positifs. Par la suite, dans les deux élevages, cette proportion a fortement diminué pour arriver à un très faible taux à 3 semaines, avec 5 % et 9 % de positifs respectivement dans les élevages A et B1. Ce faible taux est par ailleurs confirmé à 10 semaines (figure 15), où aucun animal n'est détecté comme positif dans les deux élevages.

A 16 semaines, une nette augmentation du nombre d'animaux positifs et du taux moyen d'anticorps anti-PCV2 dans les matières fécales est observée dans l'élevage A avec 50 % d'animaux détectés positifs. Dans l'élevage B (groupe B1), l'augmentation est encore plus importante et, elle est mise en évidence dès la quatorzième semaine avec 69 % d'animaux positifs, ce pourcentage passant à 76 % à 16 semaines.

Pour le groupe B2 (porcelets cliniquement atteints de MAP) de l'élevage B, les trois porcelets étaient négatifs à 1, 3 et 10 semaines. En revanche, de la même façon une augmentation nette du taux moyen d'anticorps anti-PCV2 est observée entre 10 et 14 semaines, confirmée à 16 semaines (figure 15). Le porc suivi à 14 et 16 semaines était positif au test ELISA sur matières fécales.

Les truies de l'élevage A ont toutes été détectées négatives alors que 23 % des truies de l'élevage B ont été détectées positives au test ELISA pour la détection d'anticorps anti-PCV2 dans les matières fécales.

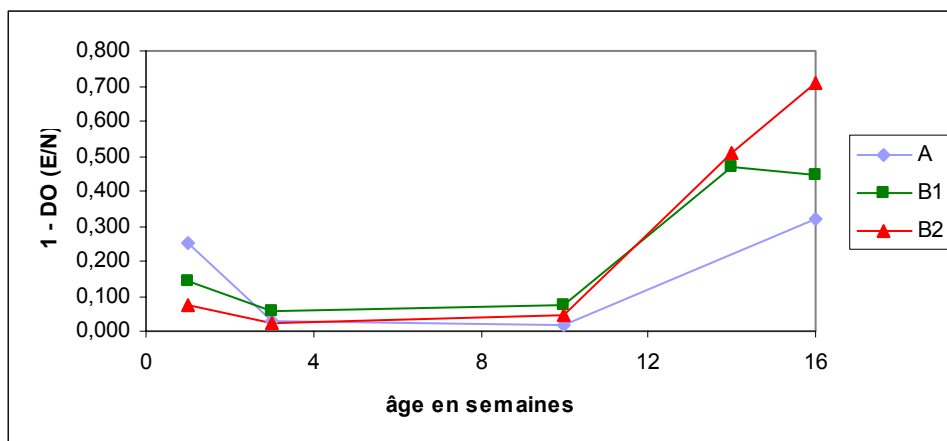


Figure 15 : évolution des moyennes des taux d'anticorps anti-PCV2 obtenus par ELISA sur matières fécales à partir de l'élevage MAP- (A) et de l'élevage MAP+ (B). Les résultats sont exprimés en densité optique (DO). E=échantillon ; N=témoin négatif. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint.

### 3-3 Hématologie

Le nombre de globules rouges est en augmentation entre 3 et 10 semaines dans les deux élevages MAP- (A) et MAP+ (B). Cette hausse est un peu plus marquée dans l'élevage A (de  $7.10^{12}$  globules rouges par litre à 3 semaines à  $9.10^{12}/L$  à 10 semaines, contre 7 à  $8.10^{12}/L$  dans le groupe B1). Ces résultats sont statistiquement significatifs ( $p<0,01$ ). Ceci est confirmé à 16 semaines (figure 16). Une augmentation plus nette est à noter dans le groupe B2 entre 10 et 16 semaines mais cette différence n'est pas statistiquement significative (à cause du faible effectif de ce groupe, un seul individu à 16 semaines). Dans l'élevage A, il semble que les porcs aient un nombre de globules rouges plus élevés que dans l'élevage B, ces résultats sont statistiquement significatifs à 3 semaines ( $p<0,02$ ) et à 10 semaines ( $p<0,01$ ).

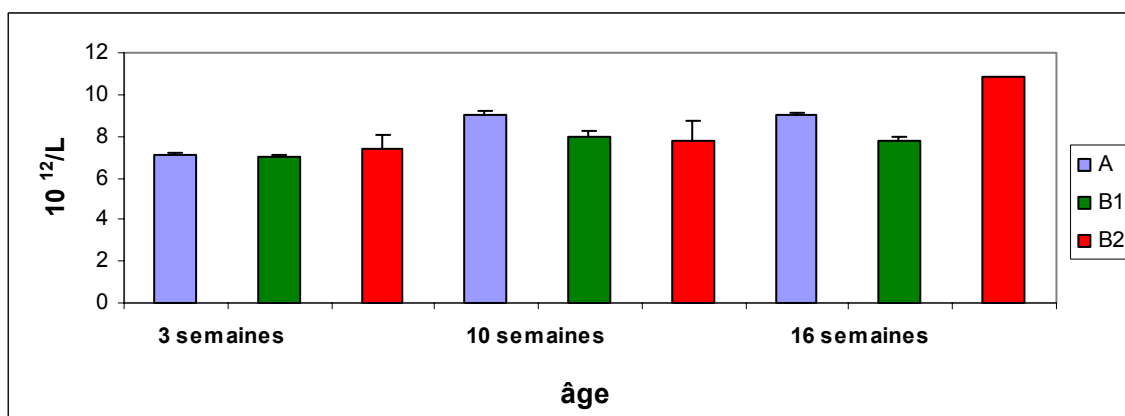


Figure 16: nombre de globules rouges dans les deux élevages sain (A) et atteint de MAP (B) en fonction de l'âge des porcelets (de la semaine 3 à 16). B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

Le taux d'hémoglobine est légèrement augmenté entre 3 et 10 semaines dans l'élevage A (passant de 11,6 à 12,7g/dL) et confirmé à 16 semaines. Cette différence est significative ( $p<0,01$ ). En revanche dans le groupe B1, l'augmentation n'est pas très nette (différence statistiquement non significative) et on peut noter une légère diminution entre 10 et 16 semaines. Dans le groupe B2, il semble y avoir une légère diminution du taux d'hémoglobine entre 3 et 10 semaines mais une augmentation entre 10 et 16 semaines chez le troisième porc survivant (figure 17). De manière générale, le taux d'hémoglobine est légèrement plus élevé dans l'élevage A que dans les groupes B1 et B2 (figure 17), la différence étant non significative à 3 semaines et significative à 10 semaines ( $p<0,05$ ).

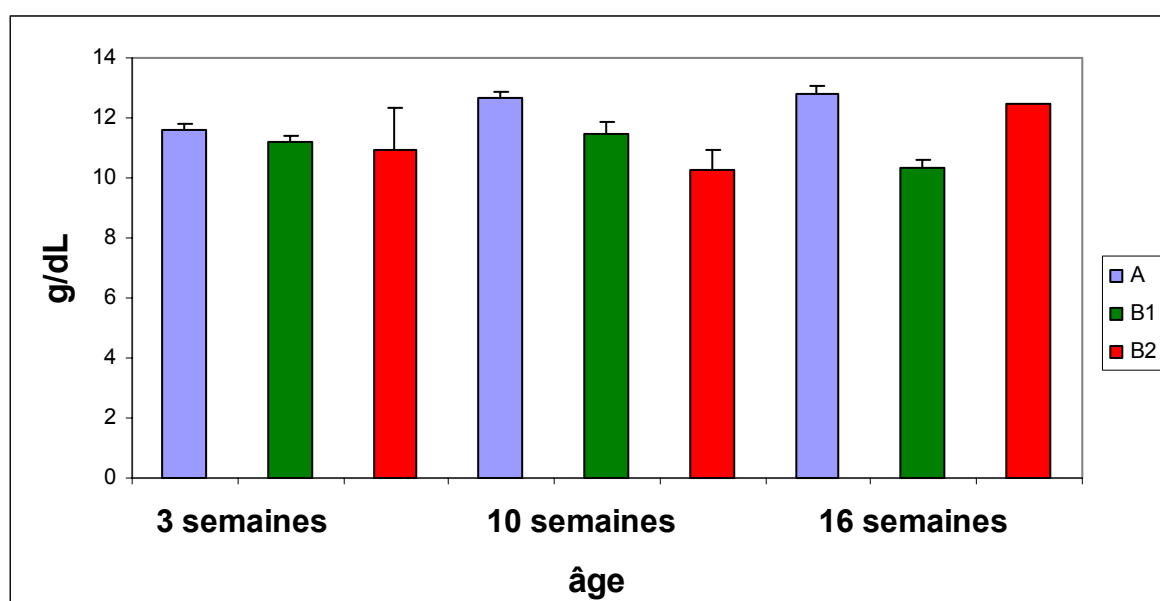


Figure 17 : analyse du taux d'hémoglobine dans les élevages sain (A) et atteint de MAP (B) selon l'âge des porcelets (en semaines). B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

En parallèle, le taux moyen d'hématocrite est aussi en augmentation (différence significative,  $p<0,001$ ) entre 3 et 10 semaines dans l'élevage A (passant de 33,5 à 38,2 %), avec une confirmation à 16 semaines. En revanche, le taux moyen d'hématocrite est stable au cours du temps dans le groupe B1 (figure 18). Dans le groupe B2, on observe une diminution du taux d'hématocrite entre 3 et 10 semaines (passant de 33 à 30 %) et une augmentation entre 10 et 16 semaines chez le porc survivant (38,5 %). L'hématocrite est plus faible à 10 semaines dans l'élevage B par rapport à l'élevage A (figure 18), et ceci de manière significative ( $p<0,01$ ).

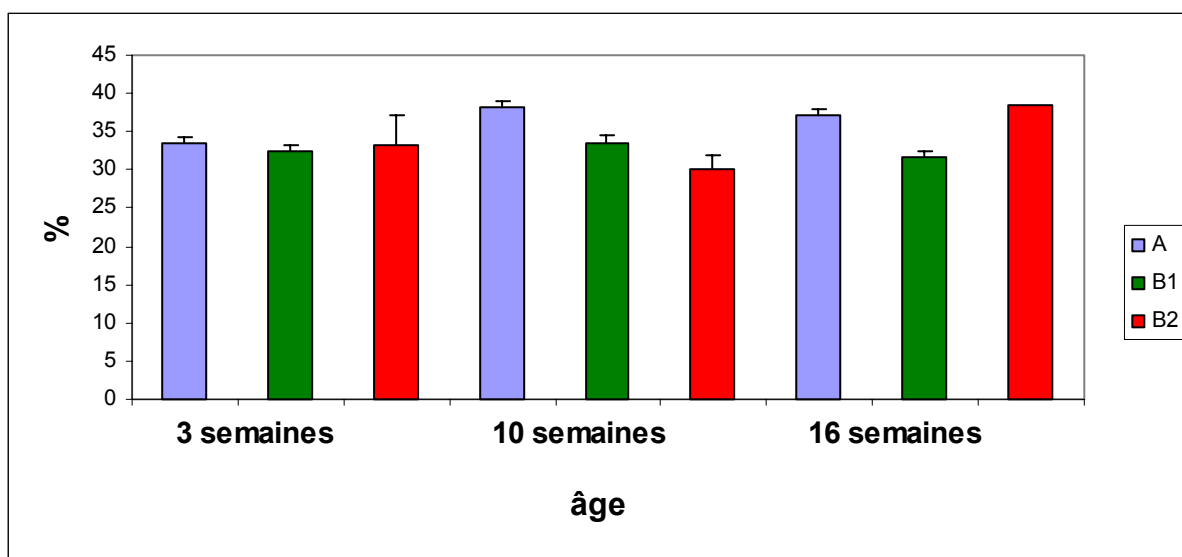


Figure 18 : analyse du taux d'hématocrite moyen dans les élevages sain (A) et atteint de MAP (B) en fonction de l'âge des porcelets (en semaines). B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

Au cours du temps, on peut noter une augmentation du nombre moyen de globules blancs entre 3 et 10 semaines dans l'élevage A, passant de 10,6 à 17,6  $10^9/L$  (différence statistiquement significative,  $p < 0,001$ ), confirmée à 16 semaines. Dans le groupe B1, cette augmentation est encore plus nette (le nombre moyen de globules blancs passant de 8 à 19  $10^9/L$ , différence statistiquement significative  $p < 0,001$ ). La même situation se retrouve dans le groupe B2 (figure 19).

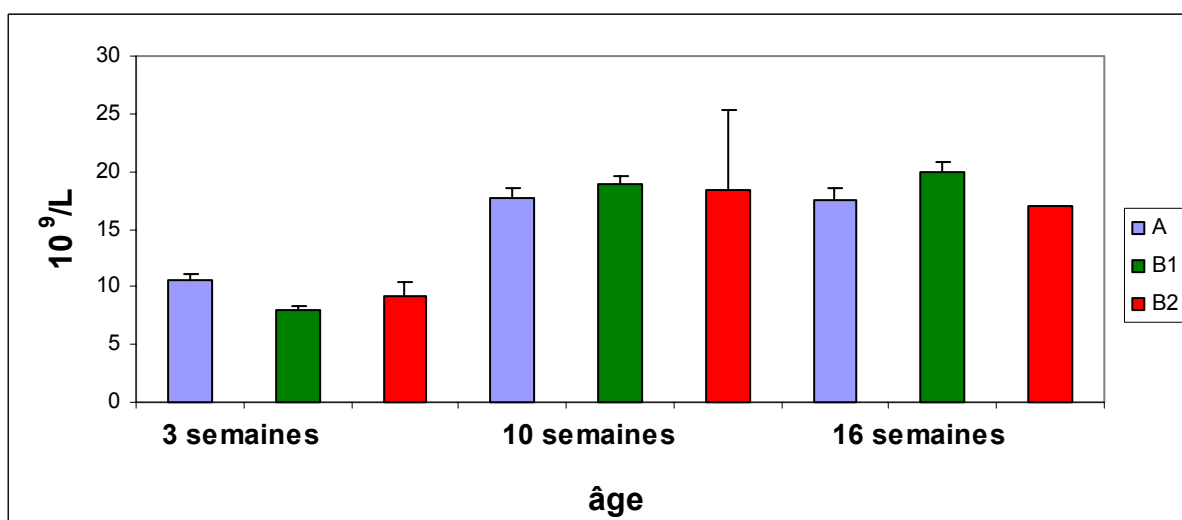


Figure 19: analyse du nombre moyen de globules blancs dans les élevages sain (A) et atteint de MAP (B), au cours des semaines 3, 10 et 16. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

L'appareil fournit également la répartition de différentes catégories de globules blancs (lymphocytes, monocytes et granulocytes).

On peut noter une prédominance du pourcentage moyen de lymphocytes (entre 60 et 70 %) sur le pourcentage moyen de granulocytes (30 à 40 %) dans les deux élevages et au cours du temps. Cependant dans le groupe B2, une diminution des lymphocytes (figure 20) est observée entre 3 et 10 semaines (passant de 68 à 53 %) et en parallèle, une augmentation des granulocytes (figure 21) entre 3 et 10 semaines (passant de 25 à 42 %). Dans l'élevage A et le groupe B1, on note aussi une légère augmentation des granulocytes entre 3 et 10 semaines (figure 21).

Les monocytes sont en faible proportion (autour de 4 à 5 %) dans les deux élevages. Cependant dans l'élevage B (groupes B1 et B2), on peut observer une diminution entre 3 et 10 semaines des monocytes (figure 22). Le pourcentage de monocytes est plus élevé dans l'élevage B à 3 semaines que dans l'élevage A.

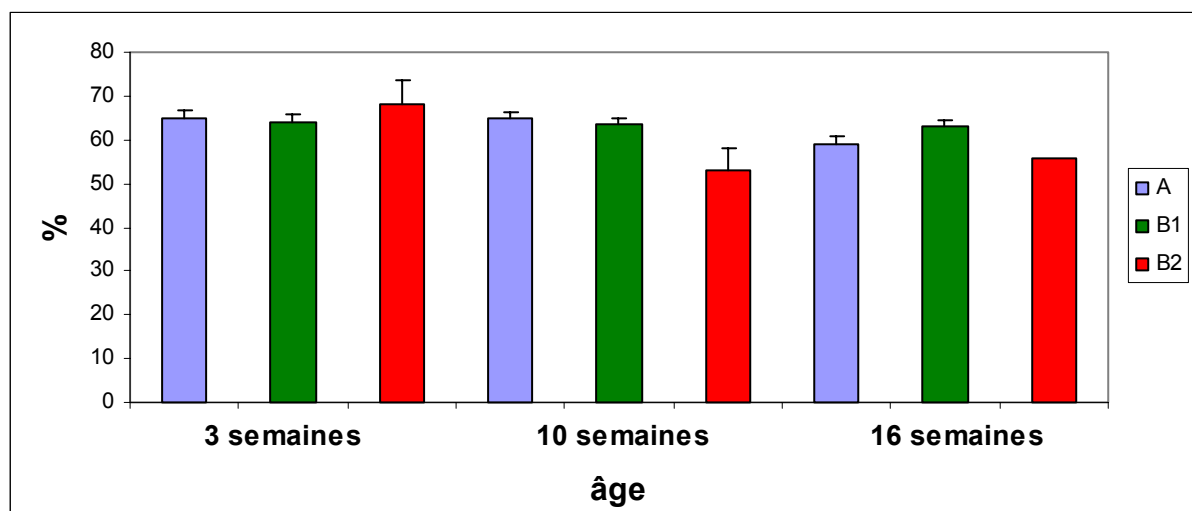


Figure 20 : analyse du pourcentage moyen de lymphocytes dans les deux élevages sain (A) et atteint de MAP (B) selon l'âge des porcelets (en semaines). B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

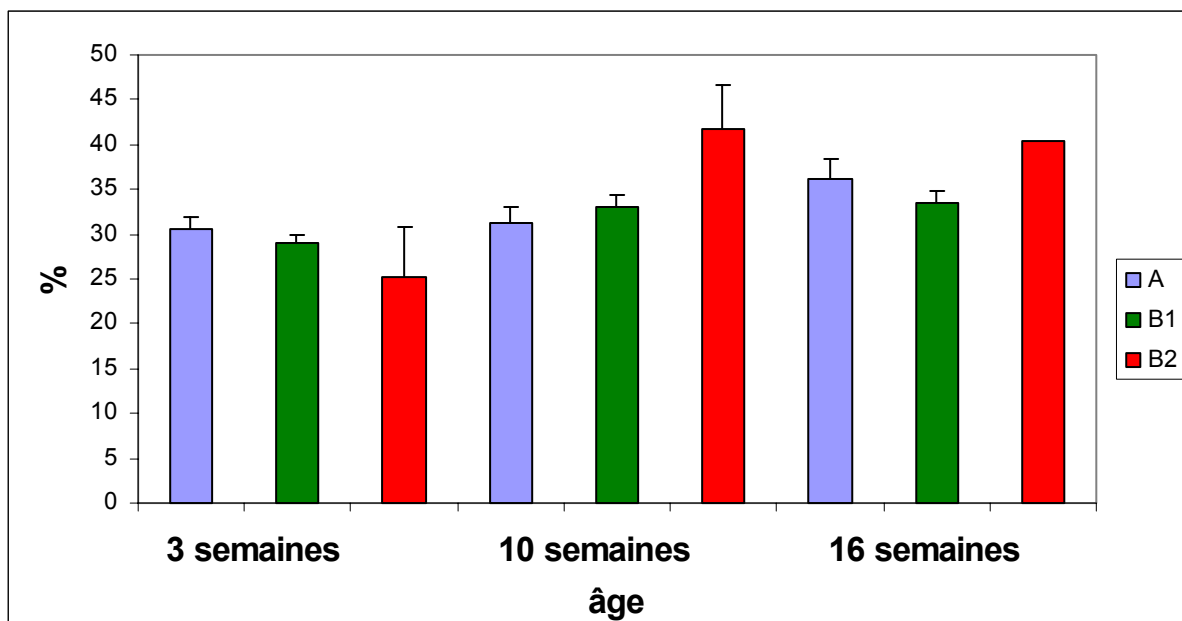


Figure 21: analyse du pourcentage moyen de granulocytes dans les deux élevages sain (A) et atteint de MAP (B) selon l'âge des porcelets. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

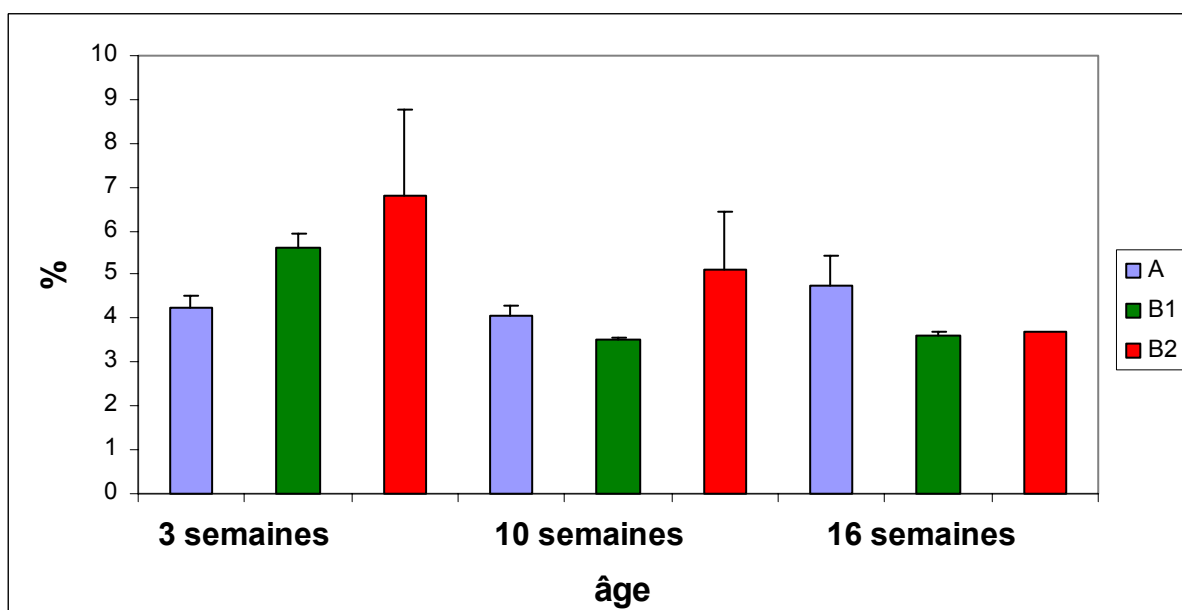


Figure 22: analyse du pourcentage moyen de monocytes dans les deux élevages sain (A) et atteint de MAP (B) selon l'âge des porcelets. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

### 3-4 Distribution des populations leucocytaires sanguines

Lors de l'analyse des résultats des marquages au cytomètre de flux, le logiciel fournit des histogrammes d'acquisition, à partir desquels les pourcentages de cellules marquées de chaque animal sont disponibles. Un exemple est donné par la figure 23.

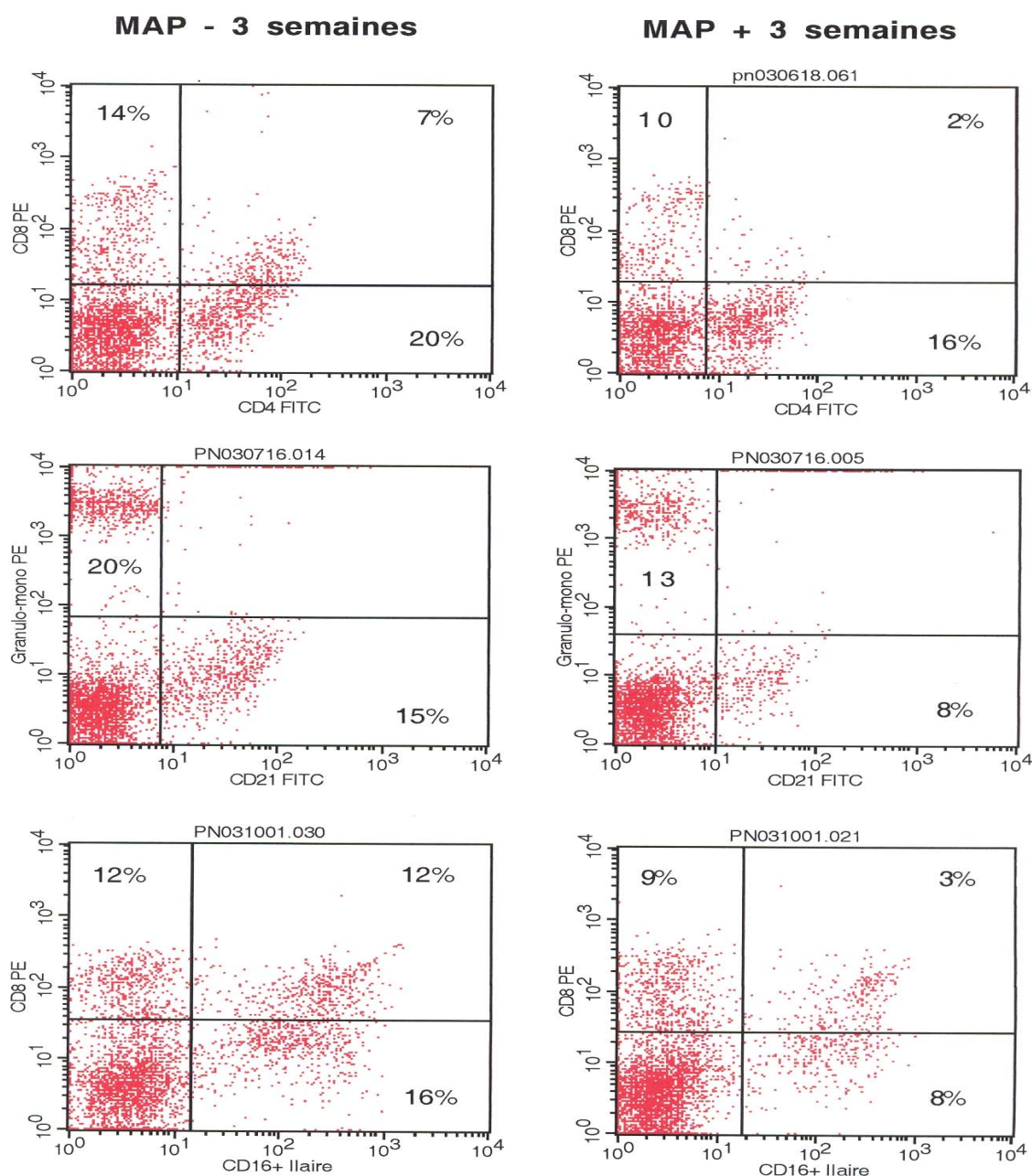


Figure 23 : Histogrammes d'acquisition au cytomètre de flux. Deux porcelets de 3 semaines d'âge sont ici analysés, un issu de l'élevage MAP- (colonne de gauche) et un issu de l'élevage MAP+ (colonne de droite), en fonction des différents marquages : CD4-CD8, CD21-monocytes et CD8-CD16. Les pourcentages représentent les valeurs des cellules marquées dans chaque cadran. Le cadran en bas à gauche correspond aux cellules négatives (non marquées). Les axes des abscisses et des ordonnées sont exprimés en intensité de fluorescence.

Ainsi, avec la figure 23, le porcelet de l'élevage MAP- possède 14 % de lymphocytes T CD8+, 20 % de lymphocytes T CD4+ et 7 % de lymphocytes T double marqués CD4+CD8+.

A l'aide du premier double marquage (CD4 et CD8), on remarque une diminution du taux de lymphocytes T CD4+ entre 3 et 10 semaines dans les deux élevages MAP- (A) et MAP+ (B), ce qui est confirmé à 16 semaines (figure 24). Cette diminution est plus marquée dans l'élevage A ; ainsi le taux passe de 23,7 % à 3 semaines à 7,65 % à 10 semaines dans l'élevage A et de 16 % à 9 % dans les groupes B1 et B2. Cette différence est statistiquement significative pour A et B1 ( $p < 0,001$ ). Le taux de lymphocytes T CD4+ semble être moins important dans l'élevage MAP+ que dans l'élevage MAP- à 3 semaines d'âge (figure 24), ce résultat est significatif ( $p < 10^{-6}$ ).

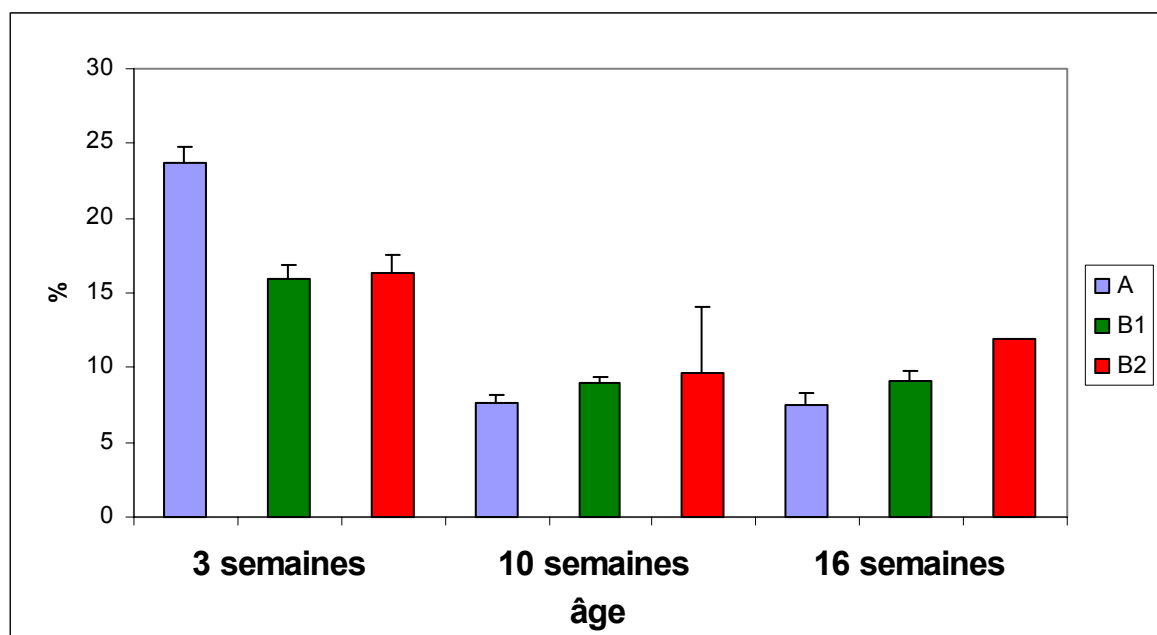


Figure 24 : analyse par cytométrie en flux du taux moyen de CD4+ au cours du temps dans les 2 élevages sain (A) et atteint (B). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentages de cellules positives. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.



Le taux de lymphocytes T CD8+ augmente dans l'élevage A et le groupe B1 (figure 25) entre 3 et 10 semaines (passant de 17 à 22 % et de 14 à 20% dans l'élevage A et le groupe B1). Ces différences sont statistiquement significatives ( $p < 0,01$ ). Pour le groupe B2, ce taux diminue également de 15 à 12 %, entre 3 et 10 semaines, mais une différence significative n'a pas pu être mise en évidence (faible nombre d'animaux dans ce groupe). Le taux de lymphocytes T CD8+ est moins important dans l'élevage B par rapport à l'élevage A à tout âge. Ce résultat est significatif ( $p < 0,002$  à 3 semaines et  $p < 0,05$  à 10 semaines).

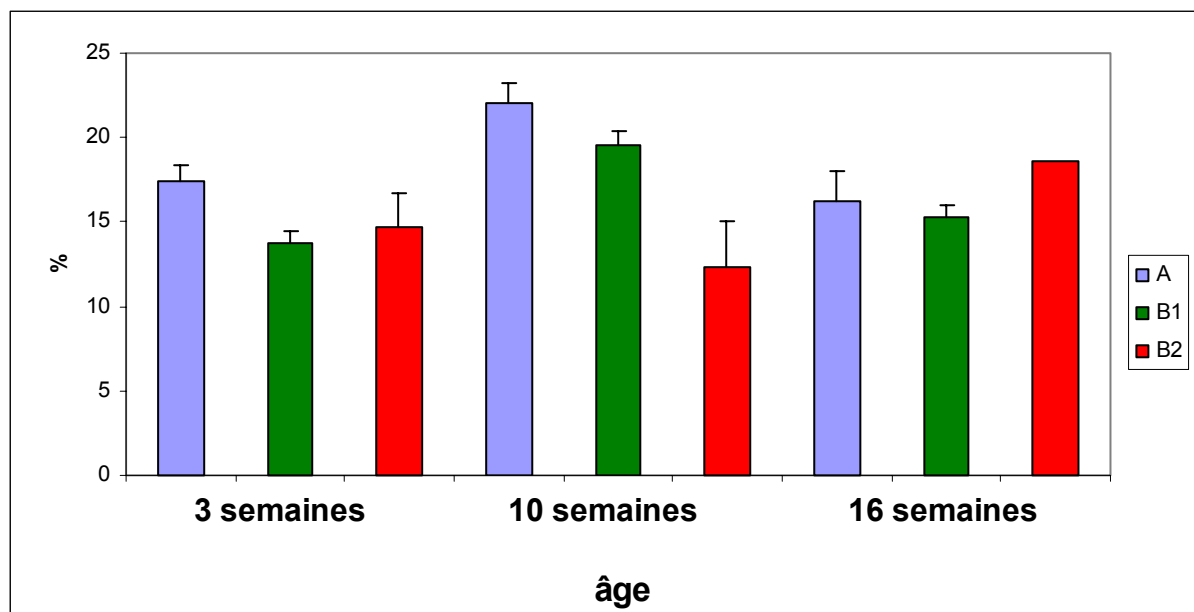


Figure 25 : analyse par cytométrie en flux du taux moyen de CD8+ au cours du temps dans les 2 élevages sain (A) et atteint (B). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentages de cellules positives. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

Ces résultats permettent d'expliquer la chute du rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> entre 3 et 10 semaines pour les deux élevages, rapport qui passe de 1,56 et 1,33 à 3 semaines, à 0,38 et 0,49 à 10 semaines, respectivement dans l'élevage A et le groupe B1 (figure 26). Ces différences sont statistiquement significatives ( $p < 0,001$ ). Pour le groupe B2, on note aussi une baisse du rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> entre les semaines 3 et 10 mais moins nette avec un rapport passant de 1,14 à 0,90 (différence non statistiquement significative à cause du faible nombre d'animaux).

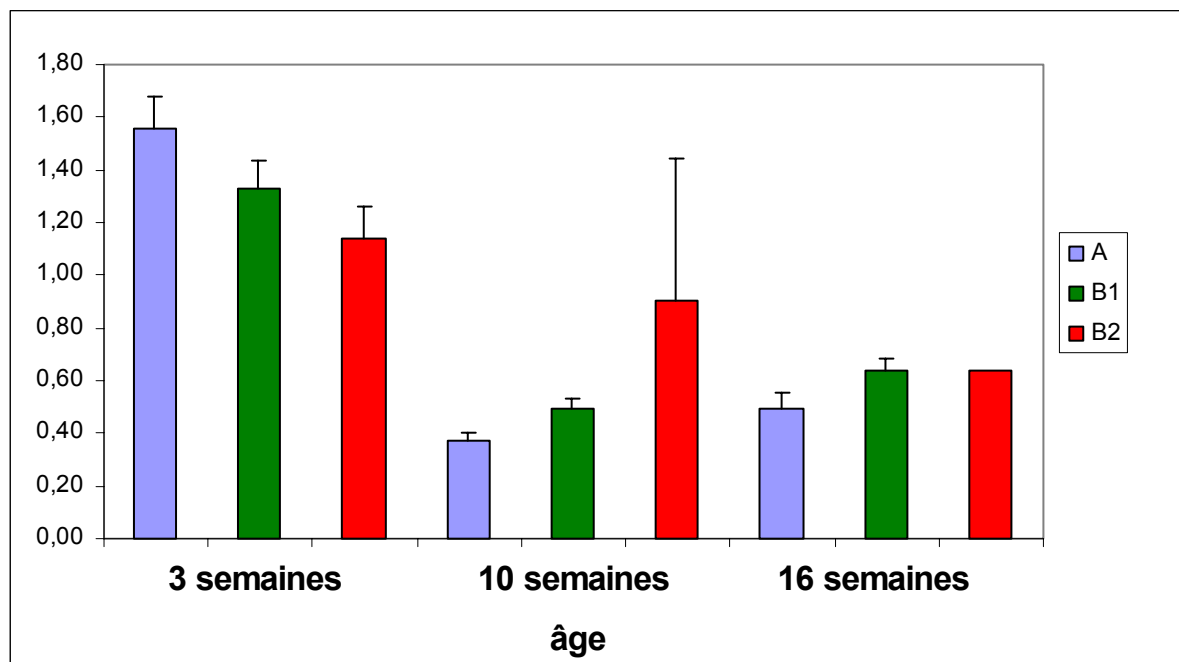


Figure 26: analyse par cytométrie en flux du rapport moyen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> au cours du temps dans les 2 élevages sain (A) et atteint de MAP (B). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentages de cellules positives. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

Les cellules doublement marquées CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> sont en proportion moins importantes, environ 4 à 8 % dans les deux élevages et au cours du temps.

Avec le deuxième double marquage (CD21 et granulocytes-monocytes), une augmentation significative ( $p < 0,001$ ) du taux de monocytes (passant de 12 à 24 %) est à noter dans l'élevage A entre 3 et 10 semaines, confirmé à 16 semaines (figure 27). En revanche, dans le groupe B1, le taux de monocytes est en diminution entre 3 et 10 semaines (passant de 14 à 10%) puis revient au même niveau (14 %) à 16 semaines (résultats non statistiquement significatifs). Dans le groupe B2, une nette augmentation de 14 à 43 % est à noter entre 3 et 10 semaines, cependant elle est difficilement interprétable car elle est due au fait d'un seul porcelet de ce groupe sur les 3 animaux.

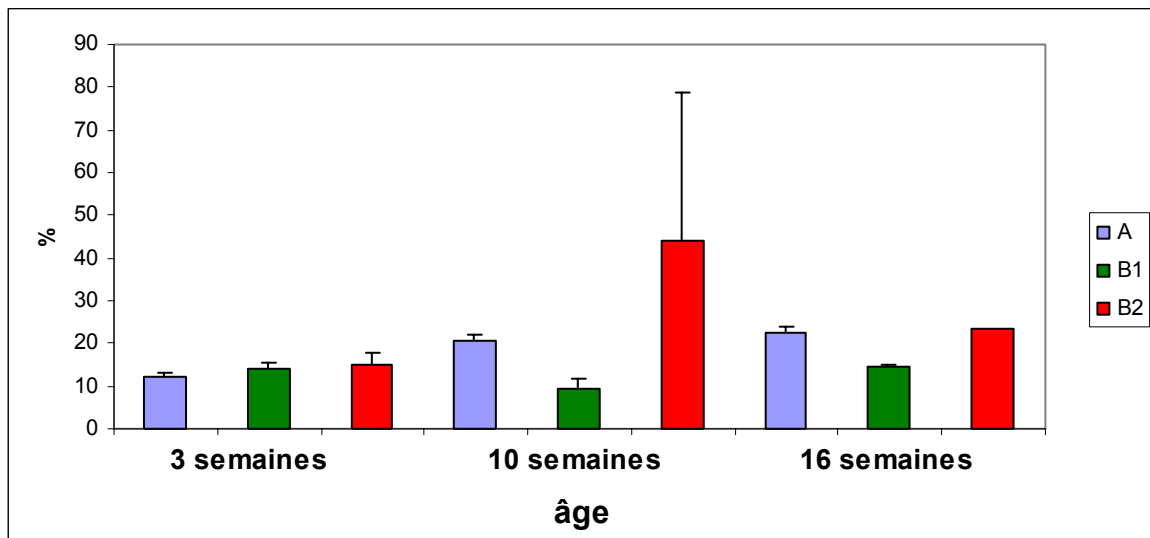


Figure 27 : analyse par cytométrie en flux du taux moyen de monocytes au cours du temps dans les 2 élevages sain (A) et atteint de MAP (B). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentages de cellules positives. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

Les lymphocytes B (marqueur CD21) sont en baisse entre 3 et 10 semaines dans les deux élevages (figure 28). Au départ, on observe un taux de 19-20 % dans l'élevage A et le groupe B1 à 3 semaines puis une baisse à 10 semaines avec 14 et 11 %, respectivement dans l'élevage A et le groupe B1. Ces différences sont statistiquement significatives ( $p < 0,001$ ). Pour le groupe B2, la même tendance est observée (figure 28), non statistiquement significative (faible effectif du groupe).

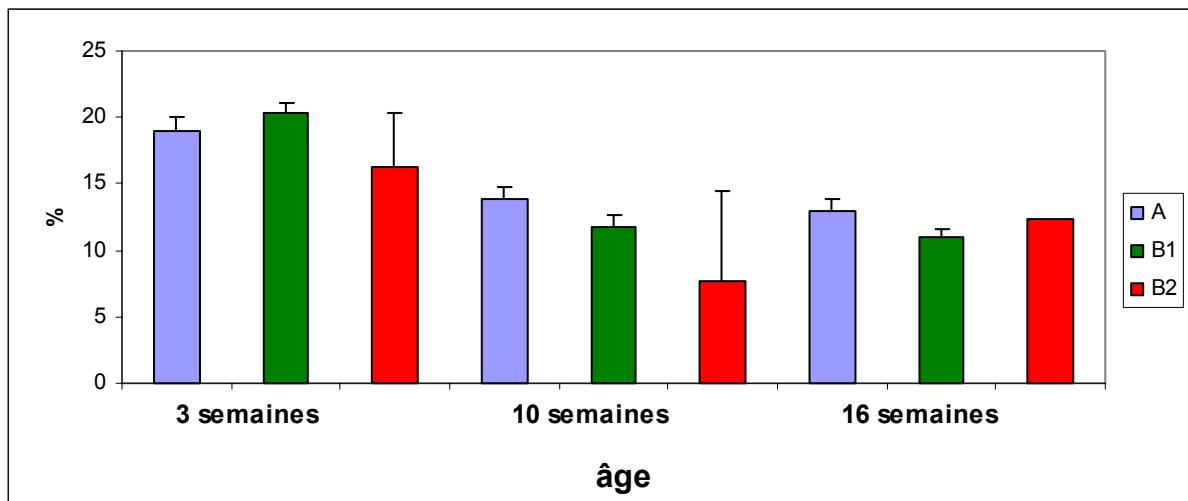


Figure 28 : analyse par cytométrie en flux du taux moyen de lymphocytes B au cours du temps dans les 2 élevages sain (A) et atteint de MAP (B). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentages de cellules positives. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

A l'aide du troisième double marquage, on peut noter une augmentation du taux moyen de CD16 (marqueur des cellules NK) entre 3 et 10 semaines dans les 2 élevages (figure 29) et ceci de manière significative ( $p < 0,001$ ). En effet le taux moyen de cellules NK passe de 16 % à 24 % dans l'élevage MAP- et de 7 % à 20 % dans l'élevage MAP+, respectivement à 3 et 10 semaines. De plus le niveau de CD16 est plus élevé dans l'élevage MAP- (A) que dans l'élevage MAP+ (B), quelque soit l'âge des porcelets (figure 29), là encore de manière significative ( $p < 0,001$  à 3 semaines et  $p < 0,05$  à 10 semaines).

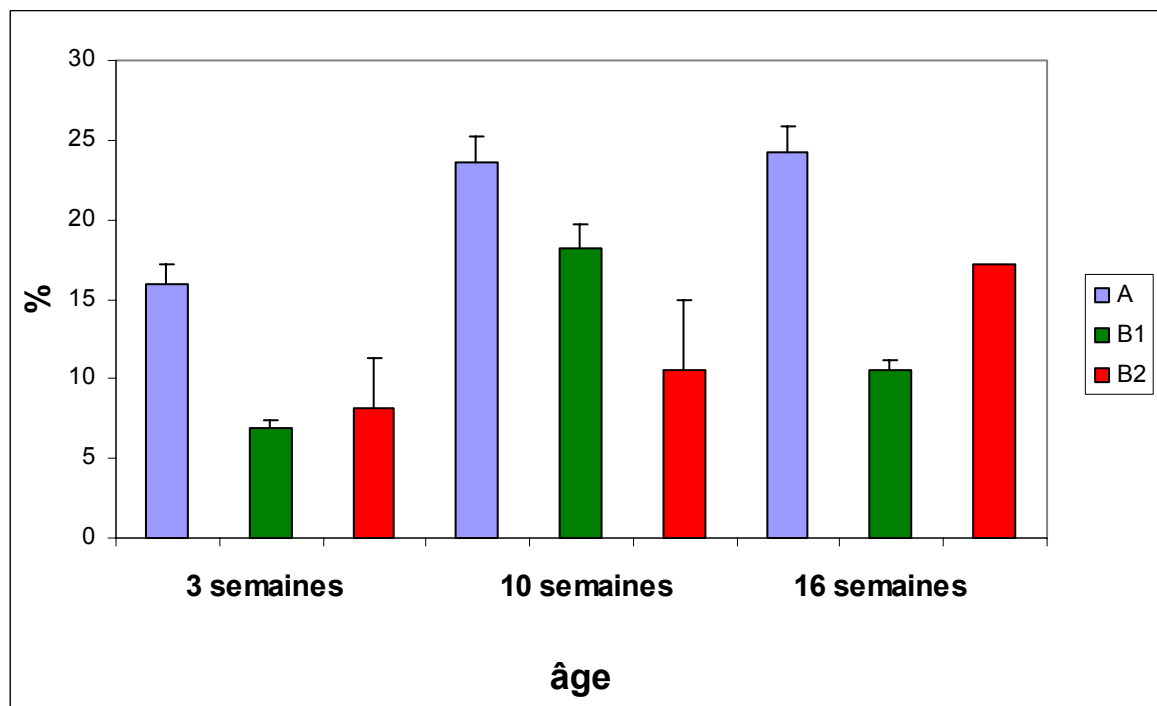


Figure 29 : analyse par cytométrie en flux du taux de cellules NK (marqueur CD16+) au cours du temps dans les 2 élevages sain (A) et atteint de MAP (B). Les résultats sont exprimés en moyenne de pourcentages de cellules positives. B1= porcelets sains dans l'élevage atteint ; B2= porcelets malades dans l'élevage atteint. Les barres verticales représentent l'écart-type des moyennes.

### **3-5 Développement, mise au point et résultats d'un test PCR pour la détection spécifique du PCV2**

Une nouvelle PCR nichée a été développée dans notre étude pour la détection différentielle du PCV1 et du PCV2.

Après extraction, l'ADN du PCV2 de la souche Stoon (titrant à  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL) a été dilué de  $10^{-1}$  à  $10^{-15}$ . En première PCR (détectant PCV1 et PCV2), nous avons observé un signal d'environ 800pb jusqu'à  $10^{-4}$ , voire  $10^{-5}$  (figure 30). Et en deuxième PCR (spécifique du PCV2), un signal d'un peu plus de 200pb était présent jusqu'à  $10^{-8}$  (figure 31).

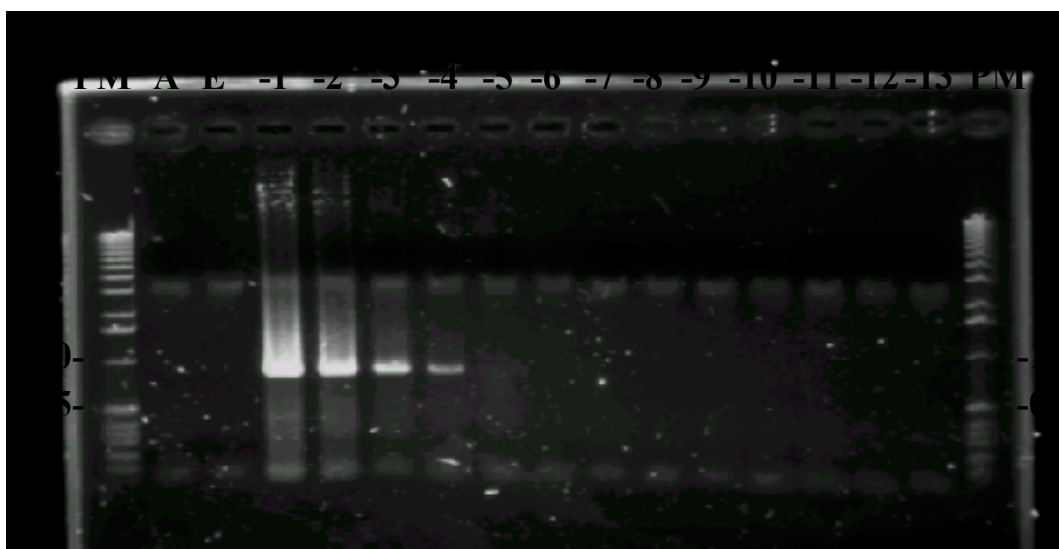


Figure 30 : produits d'amplification en première PCR (amorces communes PCV1 et PCV2) de la souche Stoon du PCV2 diluée après extraction de  $10^{-1}$  à  $10^{-13}$ . PM = poids moléculaire (Kb). A = témoin négatif PCR1 (eau). E = témoin négatif d'extraction (eau testée par PCR après extraction selon le même protocole que les échantillons).

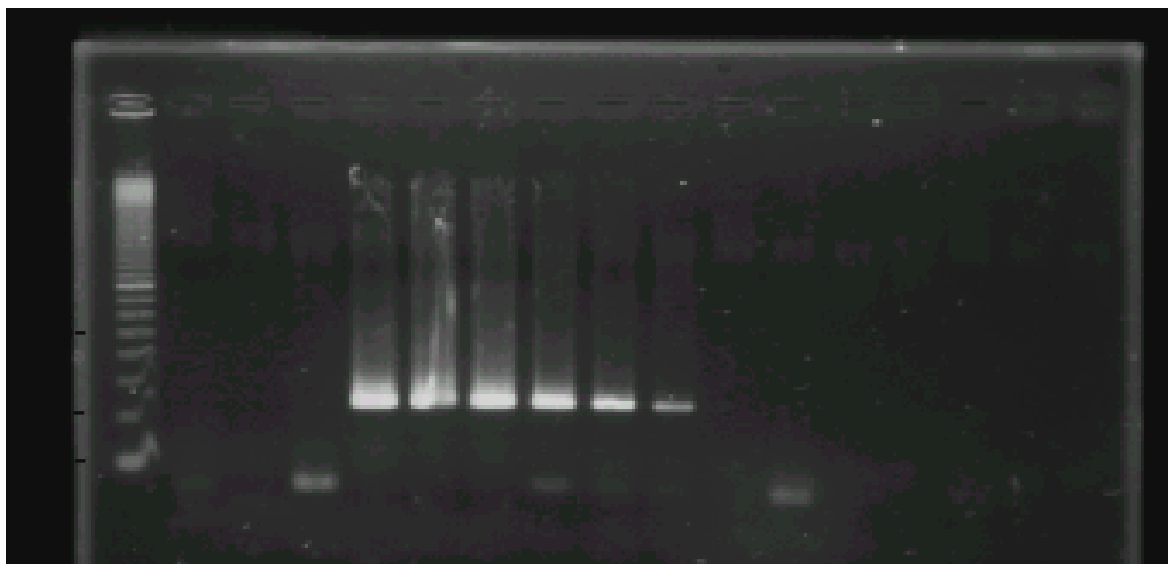


Figure 31 : produits d'amplification en deuxième PCR (amorces spécifiques PCV2) de la souche Stoon du PCV2 diluée après extraction de  $10^{-1}$  à  $10^{-15}$ . PM = poids moléculaire (Kb). A = témoin négatif PCR1 (eau). B = témoin négatif PCR2 (eau). E = témoin négatif d'extraction (eau testée par PCR après extraction selon le même protocole que les échantillons).

La même méthode a été appliquée pour le PCV1 (CCL33 cells). En première PCR un signal de 800 pb a été observé jusqu'à  $10^{-5}$  (figure 32). Par contre comme attendu, aucun signal (figure 33) n'était visible en deuxième PCR, spécifique du PCV2.

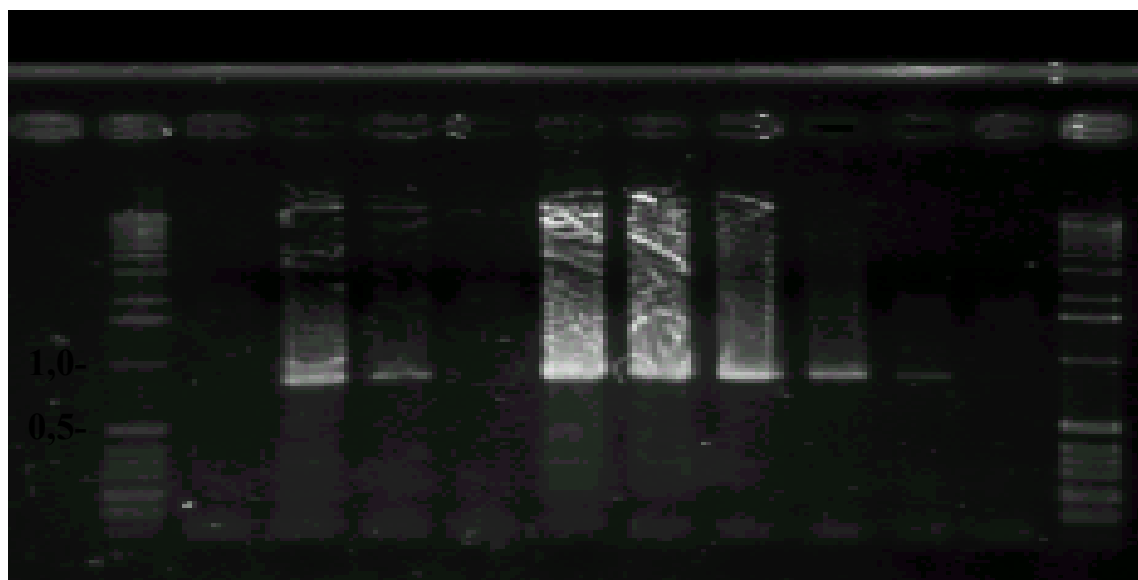


Figure 32 : produits d'amplification en première PCR (amorces communes PCV1 et PCV2) du PCV1 dilué après extraction de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ . PM = poids moléculaire (Kb). A = témoin négatif PCR1 (eau). E = témoin négatif d'extraction (eau testée par PCR après extraction). P1= témoin positif, dilution du PCV2 à  $10^{-3}$ . P2= témoin positif, dilution du PCV2 à  $10^{-4}$ .

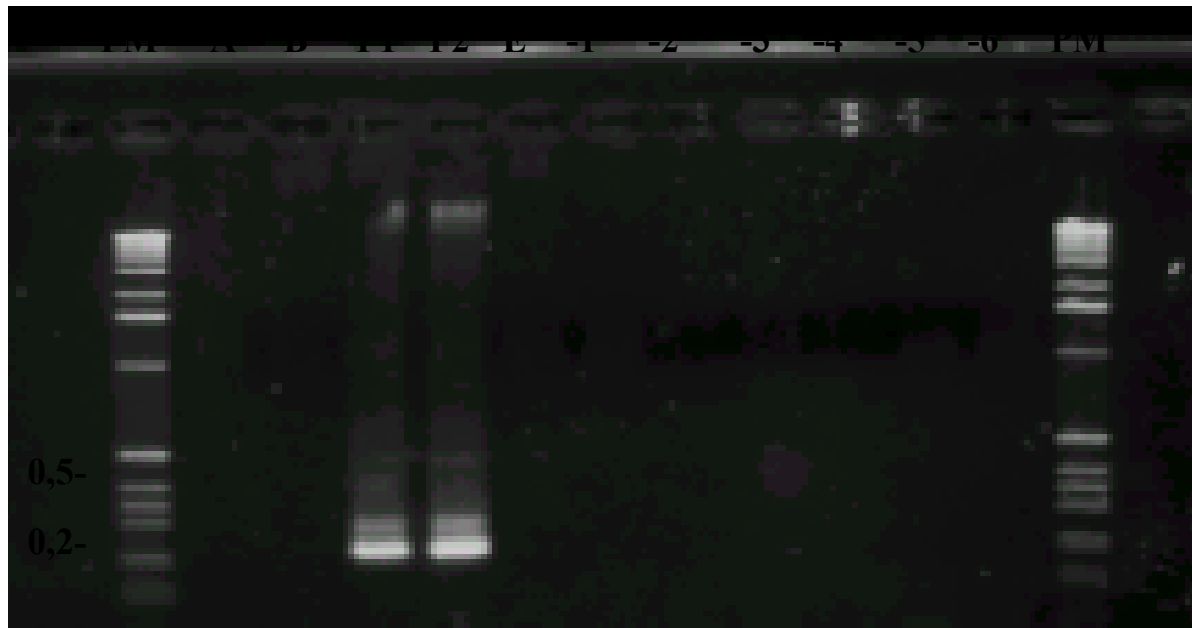


Figure 33 : produits d'amplification en deuxième PCR (amorces spécifiques PCV2) du PCV1 dilué après extraction de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ . PM = poids moléculaire (Kb). A = témoin négatif PCR1 (eau). E = témoin négatif d'extraction (eau testée par PCR après extraction). B= témoin négatif PCR2 (eau). P1= témoin positif, dilution du PCV2 à  $10^{-3}$ . P2= témoin positif, dilution du PCV2 à  $10^{-4}$ .

La détection du PCV2 par PCR a été ensuite testée à partir de PCV2 dilué au 1/100 dans du sérum négatif. L'ADN extrait a été ensuite dilué de 10 en 10 jusqu'à  $10^{-10}$ . Le PCV2 a pu être détecté jusqu'à une dilution finale de  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$ , respectivement en première et deuxième PCR.

Tous les sérums récoltés dans les élevages A et B ont été testés. A 3 semaines d'âge, la présence de PCV2 dans le sérum a été observée chez un seul porcelet dans l'élevage non atteint (A). En revanche, aucun porcelet n'a été détecté positif par PCR nichée à 3 semaines dans l'élevage atteint de MAP (B). Par la suite, une forte augmentation de la positivité a été observée entre 3 et 10 semaines dans les deux élevages, avec un pourcentage d'animaux positifs de 63 % et 89 %, respectivement dans l'élevage A et B (cette différence est statistiquement significative,  $p < 0,02$ ). A 16 semaines, le nombre de positifs était encore plus élevé dans l'élevage B où il atteignait les 100 %, par rapport à l'élevage A avec 75 % (différence statistiquement significative,  $p < 0,001$ ). En revanche, les truies sont toutes négatives pour la détection du PCV2 dans le sérum dans les deux élevages. Les résultats sont résumés dans le tableau 3.



Tableau 3 : Résultats de la détection du PCV2 par PCR nichée dans les échantillons de sérums chez les porcelets selon leur âge et chez leurs mères (truies). Les résultats sont exprimés en % de sérums PCV2 positifs ; n = effectifs des animaux testés.

Elevage	Porcelets			Truies
	Age			
	3 semaines	10 semaines	16 semaines	
A (MAP-)	5	63	75	0
	(n=37)	(n=27)	(n=12)	(n=8)
B (MAP+)	0	89	100	0
	(n=46)	(n=44)	(n=34)	(n=7)

Si on analyse les données de manière longitudinale, on peut observer que 42 % des animaux suivis dans l'élevage A étaient positifs entre 3 et 10 semaines, et le sont restés à 16 semaines d'âge et 33 % sont devenus positifs entre 10 et 16 semaines dans l'élevage A. En revanche 25 % des animaux sont devenus négatifs entre 10 et 16 semaines d'âge dans l'élevage A.

Pour les animaux du groupe B1, 87% des animaux sont devenus positifs entre 3 et 10 semaines et restés à 16 semaines et 13 % le sont devenus entre 10 et 16 semaines. Aucun animal suivi du groupe B1 n'est devenu négatif au cours du temps et tous les animaux étaient positifs à 16 semaines.

Le seul animal qui a pu être suivi à 3, 10, et 16 semaines du groupe B2 est devenu positif entre 3 et 10 semaines d'âge.

Les résultats du suivi longitudinal sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4: résultats de la PCR nichée sur sérums au cours du suivi longitudinal des animaux (à 3, 10 et 16 semaines d'âge) dans les deux élevages A et B (groupes B1 et B2).

Statut virologique			Elevage A		Groupe B1		Groupe B2	
3 semaines	10 semaines	16 semaines	n	%	n	%	n	%
-	-	-	0	0	0	0		
-	-	+	4	33	4	13		
-	+	+	5	42	27	87	1 <sup>a</sup>	100
-	+	-	2	17	0	0		
+	+	+	0	0	0	0		
+	+	-	1	8	0	0		
+	-	-	0	0	0	0		
+	-	+	0	0	0	0		

a : un seul porcelet sur les 3 suivi jusqu'à 16 semaines d'âge

### **3-6 Détection de PCV2 par ELISA dans les fécès**

Le test ELISA antigènes a été réalisé sur tous les échantillons de matières fécales de porcs de l'élevage A (à 1, 3, 10 et 16 semaines), des porcs de l'élevage B (à 1, 3, 10, 14 et 16 semaines), ainsi que sur les truies des deux élevages.

Dans l'élevage A (MAP -), 3 % de porcelets d'une semaine étaient positifs d'après les seuils calculés selon les recommandations du fabricant, et 6 % dans l'élevage B (MAP +). Ensuite, une augmentation du nombre de porcelets positifs a été mise en évidence, à 3 et 10 semaines dans les deux élevages. En effet, dans l'élevage A, 13 et 22% des porcelets étaient testés positifs, respectivement à 3 et 10 semaines. Dans l'élevage B, 9 et 29 % des porcelets étaient déclarés positifs au test, respectivement à 3 et 10 semaines.

A 16 semaines, aucun porc testé dans l'élevage A n'était positif au test. En revanche, dans l'élevage B, 37 % et 29 % des porcs testés étaient positifs, respectivement à 14 et 16 semaines.

Il est à noter que les différences entre les deux élevages ne sont pas statistiquement significatives à 1, 3 et 10 semaines d'âge. En revanche, à 16 semaines d'âge, la différence est statistiquement significative ( $p < 0,05$ ).

Les truies ont également été testées : aucune truie n'était déclarée positive au test dans l'élevage A et 15 % des truies étaient positives dans l'élevage B. Cette différence n'est pas statistiquement significative.

Les résultats sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : récapitulatif des résultats du test ELISA antigène sur matières fécales des porcelets selon leur âge et chez leurs mères, dans les 2 élevages A et B. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'animaux positifs au test. NT = non testé ; n= effectif des animaux testés.

Elevage	Porcelets (%)					Truies
	Age (semaines)					
	1	3	10	14	16	
A (MAP-)	3	13	22	NT	0	0
	(n= 33)	(n=38)	(n=27)		(n=12)	(n=12)
B (MAP+)	6	9	29	37	29	15
	(n=35)	(n= 35)	(n= 35)	(n=26)	(n=35)	(n=13)

### **3-7 Analyses anatomopathologiques**

#### 3-7-1 : analyses anatomopathologiques macroscopiques

Cinq animaux, notés A1 à A5, ont été autopsiés (après tirage au sort) dans l'élevage A. Aucun porc ne présentait des signes cliniques ou des lésions macroscopiques caractéristiques de la MAP (tableau 6).

Tableau 6 : récapitulatif des résultats des autopsies réalisées sur les 5 animaux tirés au sort dans l'élevage A.

Porc	Age (Semaines)	Aspect physique Signes cliniques	Autopsies Lésions nécropsiques
A1	10	Aucun	Nœuds lymphatiques : hypertrophie des nœuds mésentériques Poumon : normal Autres : aucune lésion
A2	10	Aucun	Nœuds lymphatiques : normal Poumon : normal Autres : aucune lésion
A3	18	Aucun	Nœuds lymphatiques : normal Poumon : normal Autres : aucune lésion
A4	18	Aucun	Nœuds lymphatiques : normal Poumon : normal Autres : aucune lésion
A5	18	Aucun	Nœuds lymphatiques : normal Poumon : normal Autres : aucune lésion

Dix animaux, notés B1 à B10, ont été autopsiés dans l'élevage B. Tous les porcs présentaient un état d'amaigrissement plus ou marqué avec une ligne du dos visible. Une anémie et une déshydratation étaient à noter. Soixante dix % des porcs présentaient une hypertrophie modérée à sévère des nœuds lymphatiques inguinaux superficiels et 60 % une hypertrophie modérée à sévère des nœuds lymphatiques mésentériques. 30 % des animaux montraient un œdème du mésocolon. Dans 40 % des cas, une diarrhée était notée et 30 % avaient de l'ascite.

Quatre vingt dix % des porcs présentait un poumon en damier signant une pneumonie avec pour la plupart une contenu spumeux à la sortie des bronches en pressant sur le poumon. Les nœuds lymphatiques trachéobronchiques étaient augmentés de volume pour 6 porcs. Les résultats des analyses au niveau macroscopique sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7: récapitulatif des résultats des autopsies réalisées sur les 10 animaux autopsiés de l'élevage atteint de MAP (B)

Porc	Age (semaines)	Aspect physique Signes cliniques	Autopsies Lésions nécropsiques
B1 <sup>a</sup>	15	Anémie cachexie	Nœuds lymphatiques : normaux Poumon : pneumonie en damier, contenu spumeux des bronches Autres : œdème du mésocolon
B2 <sup>a</sup>	14	Anémie, maigreur, diarrhée	Nœuds lymphatiques : hypertrophie généralisée Poumon : pneumonie en damier Autres : aucune lésion
B3 <sup>a</sup>	12	Anémie, maigreur, diarrhée	Nœuds lymphatiques : hypertrophie généralisée Poumon : pneumonie en damier Autres : nécrose des oreilles, péricardite
B4 <sup>a</sup>	12	Anémie, maigreur, diarrhée	Nœuds lymphatiques : hypertrophie des mésentériques Poumon : pneumonie en damier Autres : ascite, péricardite
B5 <sup>b</sup>	10	Anémie maigreur	Nœuds lymphatiques : hypertrophie généralisée Poumon : pneumonie en damier Autres : nécrose des oreilles, œdème du mésocolon
B6 <sup>b</sup>	13	Maigreur	Nœuds lymphatiques : hypertrophie des inguinaux superficiels et trachéobronchiques Poumon : pneumonie en damier Autres : aucune lésion
B7 <sup>b</sup>	13	Maigreur	Nœuds lymphatiques : hypertrophie généralisée Poumon : pneumonie en damier, pleurésie Autres : ascite
B8 <sup>c</sup>	14	Maigreur diarrhée	Nœuds lymphatiques : hypertrophie des inguinaux Poumon : pneumonie en damier, abcès multifocaux, pleurésie Autres : nécrose des oreilles
B9 <sup>c</sup>	17	Petite taille	Nœuds lymphatiques : normal Poumon : normal Autres : aucune lésion
B10 <sup>c</sup>	17	Petite taille	Nœuds lymphatiques : hypertrophie généralisée Poumon : pneumonie en damier, abcès de grandes tailles intrapulmonaires, pleurésie Autres : ascite, œdème du mésocolon, hépatomégalie, péricardite

a= porcelets ne faisant pas partie de la bande suivie ; b = porcelets faisant partie de la bande suivie mais non identifiés à la naissance, c= porcelets faisant partie des animaux suivis depuis la naissance.

### 3-7-2 : analyses anatomopathologiques microscopiques

Les analyses histologiques ont été réalisées à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Les 5 animaux de l'élevage A ne présentaient aucune lésion histologique.

Les 10 animaux de l'élevage B ont tous présentaient des lésions histologiques variables. Une bronchite chronique suppurée est observée dans 60 % des cas. Quelques porcs présentaient une déplétion lymphocytaire avec des corps d'inclusions intracytoplasmiques dans les macrophages et quelques cellules géantes plurinucléées dans certains nœuds lymphatiques.

Le tableau 8 détaille les lésions histologiques.

Tableau 8 : récapitulatif des résultats des histologies réalisées sur les 10 animaux autopsiés de l'élevage B.

Porcs	Lésions histologiques
B1 <sup>a</sup>	Nœud trachéobronchique : présence de foyers de déplétion lymphocytaire en partie centrale avec histiocytose et des cellules géantes plurinucléées. Poumon : bronchite chronique suppurée.
B2 <sup>a</sup>	Nœud mésentérique : présence de quelques cellules plurinucléées Poumon : bronchite chronique suppurée
B3 <sup>a</sup>	Nœud inguinal : lymphadénite avec leucocytose sinusale à polynucléaires neutrophiles. Nœud mésentérique : déplétion lymphocytaire, histiocytose, nombreux corps d'inclusions intracytoplasmiques dans les macrophages. Peyer : déplétion lymphoïde et corps d'inclusions intracytoplasmiques dans les macrophages. Nœud trachéobronchique : lymphadénite avec leucocytose Poumon : bronchite chronique suppurée.
B4 <sup>a</sup>	Nœuds lymphatiques : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde et quelques cellules géantes plurinucléées. Poumon : quelques foyers de bronchiolite suppurée avec atélectasie parenchymateuse associée.
B5 <sup>b</sup>	Nœuds lymphatiques : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde et quelques cellules géantes plurinucléées. Poumon : quelques foyers de bronchiolite suppurée avec atélectasie parenchymateuse associée.
B6 <sup>b</sup>	Nœuds lymphatiques : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde et quelques cellules géantes plurinucléées. Poumon : quelques foyers de bronchiolite suppurée avec atélectasie parenchymateuse associée, thrombose, pleurésie séreuse.
B7 <sup>b</sup>	Nœuds lymphatiques : déplétion lymphocytaire d'intensité moyenne et quelques microhémorragies focales Poumon : pleuropneumonie sérofibrineuse et thrombosante
B8 <sup>c</sup>	Nœuds lymphatiques : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde et quelques cellules géantes plurinucléées. Poumon : quelques foyers de bronchiolite suppurée avec atélectasie parenchymateuse associée.
B9 <sup>c</sup>	Nœud inguinal : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde Nœud trachéobronchique : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde et quelques cellules géantes plurinucléées.
B10 <sup>c</sup>	Nœud inguinal : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde Nœud trachéobronchique : lymphadénite réactionnelle avec hyperplasie lymphoïde et quelques cellules géantes plurinucléées.

a= porcelets ne faisant pas partie de la bande suivie ; b = porcelets faisant partie de la bande suivie mais non identifiés à la naissance ; c= porcelets faisant partie des animaux suivis depuis la naissance.





## **4 – Discussion**

### **4-1 Suivi de l'infection par le PCV2**

#### **4-1-1 Suivi des anticorps anti-PCV2**

A l'aide d'un test ELISA pour la détection d'anticorps dans les matières fécales (test qui pourrait être moins sensible qu'un test sérologique classique), nous avons pu montrer qu'au moins 30 % des porcelets étaient positifs dès une semaine d'âge dans les deux élevages : atteint de MAP et indemne. Dans les études précédentes (Blanchard *et al.*, 2003 ; Larochelle *et al.*, 2003 ; Rodriguez-Arrioja *et al.*, 2002), les essais ont débutés à 3 semaines d'âge. Dans notre étude, la présence d'anticorps anti-PCV2 à une semaine signe très probablement la présence d'une immunité passive d'origine colostrale dans les deux élevages. De manière plus surprenante, cette immunité passive semblait même moins marquée dans l'élevage B (atteint de MAP) où 26 % des porcelets étaient positifs alors que 33 % des porcelets de l'élevage A étaient positifs au test ELISA à une semaine d'âge, mais cette différence n'est pas statistiquement significative. Ces anticorps d'origine maternelle décroissent, et dès 3 semaines, seulement 5 et 9 % des porcelets étaient positifs, respectivement dans les élevages sain et atteint de MAP. Ce faible taux est confirmé à 10 semaines où aucun animal n'était détecté comme positif dans les deux élevages. Une augmentation du taux moyen d'anticorps anti-PCV2 et du nombre d'animaux positifs a été observée, entre 10 et 16 semaines d'âge dans l'élevage MAP- (de 0 % de porcelets positifs à 10 semaines à 50 % de positifs à 16 semaines), ce qui signe une circulation virale aux alentours ou après 10 semaines. Le même phénomène a été également mis en évidence dans l'élevage MAP+ et semble même plus important puisque dès la quatorzième semaine, 69 % des animaux sont positifs et 76 % des porcs sont positifs à 16 semaines d'âge. Nos résultats sont également en concordance avec ceux obtenus par Blanchard *et al.* (2003) où 57 % des porcs d'un élevage MAP- présentaient une séroconversion après 13 semaines (par ELISA sur sérum). Ces résultats sont aussi en concordance aussi avec ceux de Larochelle *et al.* (2003) puisqu'ils ont montré, par immunofluorescence indirecte sur sérum, une baisse progressive des anticorps entre 3 et 11 semaines d'âge, suivie d'une séroconversion à 15 semaines et de hauts titres en anticorps anti-PCV2 par la suite chez tous les porcs. Rodriguez-Arrioja *et al.* (2002) ont montré aussi une

diminution des anticorps anti-PCV2 entre 3 et 7 semaines d'âge puis une augmentation à 12 semaines et un maintien de ces taux à 28 semaines d'âge. D'autre part, Blanchard *et al.* (2003) émettent l'hypothèse d'une infection plus précoce dans les élevages MAP+ (en post-sevrage, porcelets âgés de 7 à 10 semaines), or cela ne semble pas être le cas dans notre étude puisque tous les porcelets de l'élevage MAP+ sont négatifs à 10 semaines, de la même manière que dans l'élevage MAP-. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que Blanchard *et al.* (2003) ont analysé des élevages présentant une clinique aigue de la MAP, alors que dans notre étude, l'élevage MAP+ présente des problèmes depuis au moins 3 ans. Ainsi, malgré 60 porcelets identifiés à la naissance, peu de signes cliniques caractéristiques ont été observés si ce n'était la présence de nécroses au niveau des oreilles à 10 semaines, une mortalité brutale chez un porcelet et deux porcelets ayant présenté un amaigrissement (soit 5 % d'animaux ayant présenté des signes cliniques de MAP parmi les individus suivis depuis la naissance). De plus les lésions histologiques des porcelets autopsiés dans l'élevage MAP+ étaient compatibles avec la MAP mais non diagnostiques avec la MAP (à l'exception d'un porc), ce qui pose le problème de la variabilité des lésions chez des individus atteints de MAP dans un élevage où cette pathologie est présente depuis longtemps.

#### 4-1-2 Suivi de la présence du PCV2

Le statut virologique des animaux (présence de PCV2) a été suivi par un nouveau test PCR sur sérum et à l'aide d'un test ELISA sur matières fécales.

Une nouvelle PCR nichée, permettant de distinguer le PCV1 et le PCV2 en première PCR, a été développée. Cette PCR nichée (spécifique du PCV2 en deuxième PCR) semble présenter une très grande sensibilité. En effet ce test permet une détection en deuxième PCR jusqu'à  $10^{-7}$  d'un PCV2 titrant à  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL dans le sérum. Il n'y a pas eu ou peu de perte de signal dans le sérum. Dans la littérature, plusieurs PCR ont été décrites pour la détection du PCV2 avec des amorces différentes (Quintana *et al.*, 2001 ; Harms *et al.*, 2001, Larochelle *et al.*, 2000). Aucune limite de détection n'est disponible dans les articles de Harms *et al.*, 2001 et de Quintana *et al.*, 2001. En revanche, Larochelle *et al.* (2000) ont testé leur PCR nichée avec des dilutions en série (au 1/10) d'un isolat de PCV2 titrant à  $2 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL. Leur limite de détection fut de  $2.10^{-3}$  pour la première PCR et de  $2.10^{-4}$  pour la deuxième PCR.

La présence de PCV2 a pu être ainsi mise en évidence de manière sensible à partir des échantillons de sérums à l'aide de cette PCR nouvellement développée, dans l'élevage MAP+ mais aussi dans l'élevage MAP-. Dans l'élevage MAP-, 63 % des porcelets testés sont positifs

par PCR dans le sérum à partir de 10 semaines (5 % à 3 semaines) et 75 % à 16 semaines d'âge. Dans l'élevage MAP+, il y a une plus grande quantité de porcs infectés à 10 semaines, avec 89 % des porcs testés positifs (0 % de positifs à 3 semaines) et 100 % des porcs testés sont positifs à 16 semaines. Ces résultats sont comparables à ceux effectués par Rodriguez-Arrioja *et al.* (2002). En effet, aucune virémie n'a pu être mise en évidence dans leur étude à 3 semaines (PCR sur sérum). A 7 semaines d'âge, 15,3% des porcelets étaient positifs par PCR sur sérum et 62,7% à 12 semaines. En revanche, ils ont suivis les animaux plus longtemps et seuls 13, 6% des porcs étaient encore positifs à 28 semaines d'âge. Il semblerait que l'on ait plus de porcs positifs dans notre élevage MAP+ que dans le leur (89 % de porcs positifs à 10 semaines, et 62,7% à 12 semaines dans leur étude). Dans l'étude de Larochelle *et al.* (2003), la virémie pour le PCV2 (PCR sur sérum) n'a pu être détectée qu'à partir de 11 à 15 semaines d'âge (dans 4 élevages), à l'exception d'un élevage où les signes cliniques avaient été observés à 6-7 semaines d'âge. Dans notre cas, à 10 semaines, on avait déjà 89 % des porcelets positifs en PCR sur sérum. Dans l'étude de Larochelle *et al.* (2003), le PCV2 a été détecté par PCR sur sérum sur des animaux (20 %) de deux élevages MAP- à 15-19 semaines d'âge, ce qui confirme la présence du PCV2 même dans les élevages cliniquement sains. Shibata *et al.* (2002) a testé par PCR 313 sérums de porcs issus d'élevages sans signe clinique de MAP à différents âges. Il a obtenu des résultats similaires à notre élevage MAP- puisqu'il a environ 3 % de porcelets positifs au sevrage (3-4 semaines) et 67 % de porcs positifs entre 12 et 16 semaines d'âge. Dans l'élevage MAP+ de notre étude, tous les animaux testés par PCR sur sérum étaient positifs à 16 semaines et aucun animal n'était redevenu négatif. Ce qui n'était pas le cas pour 25 % des animaux de l'élevage MAP- qui sont devenus négatifs entre 10 et 16 semaines. On peut aussi constater que la présence du PCV2 a persisté au moins pendant 6 semaines pour 87 % des animaux de l'élevage MAP+ puisqu'ils étaient positifs par PCR sur sérum à 10 et 16 semaines. Une longue durée concernant la virémie avait déjà été montrée Rodriguez-Arrioja *et al.* (2002) avec la présence de PCV2 dans le sérum de porcelets (par PCR) depuis l'âge de 7 semaines jusqu'à 12 semaines, et même avec un animal encore positif à 28 semaines. Il n'est pas facile de savoir si ces animaux sont virémiques de façon continue ou intermittente et s'ils sont capables d'excréter du virus infectieux en quantité suffisante pour causer l'infection. Néanmoins, le fait de détecter la présence de PCV2 dans le sérum des animaux de manière répétée et avec un intervalle d'au moins 5-6 semaines (surtout dans l'élevage MAP+), pourrait avoir des conséquences importantes sur les modalités de transmission, circulation et persistance du PCV2 dans les élevages.

Un nouveau test ELISA pour la recherche d'antigène utilisé dans les matières fécales a été utilisé. Ce test a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de porcelets positifs entre 3 et 10 semaines dans l'élevage MAP-. En effet, 13 et 22 % des porcelets sont déclarés positifs au test ELISA (antigène), respectivement à 3 et 10 semaines d'âge dans l'élevage MAP-. Ceci montre ainsi une circulation du PCV2, même au sein d'un élevage MAP-. L'augmentation est visible dans l'élevage MAP+ où 9 et 29 % des porcelets sont déclarés positifs au test ELISA sur matières fécales, respectivement à 3 et 10 semaines. En revanche, aucun porc n'est détecté positif à 16 semaines dans l'élevage MAP- alors que 37 et 29 % de porcs sont positifs au test ELISA sur les matières fécales dans l'élevage MAP+ à 14 et 16 semaines.

Ces résultats permettent de mettre en évidence une excrétion du PCV2 dans les matières fécales au sein de deux élevages, atteint de MAP et sain. Ceci permet ainsi d'avoir une évaluation de la présence du virus et peut conforter l'hypothèse d'une transmission horizontale directe à partir des matières fécales (Calsamiglia *et al.*, 2002). Ce test est nouveau et facile d'utilisation. Il est peut être moins sensible, mais ceci reste à prouver avec la mise au point de la PCR sur matières fécales.

Les mères des animaux suivis ont aussi été testées par ELISA sur matières fécales et par PCR nichée. Les résultats sont assez surprenants puisque aucune truie n'est déclarée positive par PCR sur sérum que ce soit dans l'élevage MAP- ou MAP+. Avec le test ELISA sur matières fécales, aucune truie n'est déclarée positive au test ELISA sur matières fécales dans l'élevage MAP- et 15 % des truies sont positives dans l'élevage MAP+. Peu d'études dans la littérature ont porté sur les truies. Dans l'étude de Shibata *et al.* (2002), environ 5 % des truies issues d'élevage MAP- sont positives par PCR sur sérum. Dans l'étude de Rodriguez-Arrioja *et al.* (2003), une truie sur 29 testées s'est avérée positive (3,4 %) par PCR sur sérums. Les truies arrivaient peut-être à se débarrasser du virus grâce à un système immunitaire performant.

## **4-2 Hématologie et distribution des populations leucocytaires sanguines**

### **4-2-1 Hématologie**

Les analyses hématologiques ont montré que toutes les valeurs obtenues pour les différents paramètres mesurés étaient comprises dans les valeurs usuelles (Kaneto *et al.*, 1997 ; Meyer *et al.*, 1998).

Aucune anémie n'a pu être mise en évidence dans l'élevage MAP- mais également dans l'élevage MAP+. En effet, une augmentation du nombre de globules rouges dans le temps est observée pour les 2 élevages, ainsi qu'une augmentation de l'hémoglobine entre 3 et 10 semaines dans l'élevage MAP- et une stabilité pour l'élevage MAP+, et enfin une stabilité dans le temps du taux d'hématocrite pour les 2 élevages. Ceci n'est pas en accord avec Martelli *et al.* (2001), ni Ségalès *et al.* (2001). En effet, ces auteurs avaient remarqué une diminution du nombre de globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite chez les animaux atteints de MAP (Ségalès *et al.*, 2001 ; Martelli *et al.*, 2001) et une baisse du volume globulaire moyen (Martelli *et al.*, 2001). Ceci leur permettait de dire que les porcs atteints de MAP présentaient une anémie hypochrome microcytaire. Dans leurs études, les porcs atteints de MAP présentaient des ulcères gastriques, ce qui pouvait peut-être expliquer leurs résultats concernant l'anémie.

De manière générale, l'analyse hématologique reste difficile à interpréter et les résultats ne sont pas très concluants quant à une interprétation simple des différences observées entre les élevages.

Les résultats sur la distribution des globules blancs montrent une augmentation du nombre de globules blancs, après sevrage, entre 3 et 10 semaines dans les 2 élevages (de  $10,6 \cdot 10^9/L$  à  $17,6 \cdot 10^9/L$  dans l'élevage MAP- et de  $8 \cdot 10^9/L$  à  $19 \cdot 10^9/L$  dans l'élevage MAP+, respectivement à 3 et 10 semaines). On note aussi une prédominance des lymphocytes (60 à 70 %) sur les granulocytes (30 à 40 %) dans les 2 élevages. Mais dans le groupe avec les 3 porcelets ayant développé des signes cliniques de MAP (groupe B2), on peut noter une tendance à l'inversion de la formule sanguine avec une baisse des lymphocytes (68 % à 3 semaines et 53 % à 10 semaines) et une hausse des granulocytes (25 % à 3 semaines à 42 % à 10 semaines). Dans la littérature, il est également mis en évidence une inversion de la formule sanguine comme l'ont montré Ségalès *et al.* (2000) avec 52,5 % de granulocytes et 39,7 % de lymphocytes chez des porcs atteints de MAP alors que les animaux sains avaient 61 % de

lymphocytes et 38 % de granulocytes. Ségalès *et al.* (2001) a montré des résultats similaires dans une autre étude.

#### 4-2-2 Distribution des populations leucocytaires

Les résultats de l'étude de la distribution des différentes populations cellulaires sanguines par cytométrie en flux s'avèrent intéressants. A l'exception de Joling *et al.* (1994), qui n'avaient pas étudié la MAP mais simplement suivi des porcs SPF d'une semaine d'âge à 40 semaines, aucune autre étude longitudinale de ce type n'avait été ainsi réalisée dans un élevage MAP+ et un élevage MAP-.

Dès 3 semaines d'âge, le taux moyen de lymphocytes T CD4+ était significativement moins important dans l'élevage MAP+ par rapport à l'élevage MAP-. Ce taux a ensuite baissé, après sevrage, entre 3 et 10 semaines pour l'élevage MAP- (23,7 % à 3 semaines à 7,7 % à 10 semaines) et également dans l'élevage MAP+ (16 % à 3 semaines à 9 % à 10 semaines). Le taux moyen de lymphocytes T CD8+ a augmenté entre 3 et 10 semaines dans l'élevage MAP- (17 % à 3 semaines à 22 % à 10 semaines) et dans l'élevage MAP+ (14 % à 3 semaines à 20 % à 10 semaines), là encore le taux moyen de lymphocytes T CD8+ est plus important dans l'élevage MAP- à tout âge. Ces résultats permettent d'expliquer la chute du rapport CD4+/CD8+ entre 3 et 10 semaines dans les deux élevages (de 1,6 à 0,4 dans l'élevage MAP- et de 1,3 à 0,5 dans l'élevage MAP+, respectivement à 3 et 10 semaines). Joling *et al.* (1994) ont observé l'évolution suivante sur des porcs SPF: une augmentation du taux de lymphocytes T CD4+ (taux passant de 29 % à 1 semaine, à 36 % à 4 semaines et 37 % à 10 semaines) et du taux de lymphocytes T CD8+ au cours du temps (15 % à 1 semaine, 22 % à 4 semaines et 29 % à 10 semaines). Dans leur étude (Joling *et al.*, 1994), le rapport CD4+/CD8+ baisse également au cours du temps en passant de 2,3 à une semaine, à 1,7 à 4 semaines et 1,3 à 10 semaines. L'âge semble être un facteur important à prendre en compte pour le suivi de l'évolution des taux des différentes cellulaires et pour l'interprétation des résultats. Concernant la MAP, les différentes études réalisées ne semblent pas avoir tenu compte de ce facteur âge (Martelli *et al.*, 2001 ; Nielsen *et al.*, 2001). Ségalès *et al.* (2001) montrent, sur des porcs de 10-12 semaines d'âge (sans suivi longitudinal), un ratio de CD4+/CD8+ de 0,8 chez des porcs sains et de 0,3 chez des porcs avec MAP, ratio semblable à celui obtenu dans notre étude au cours du temps dans l'élevage MAP- et MAP+. Le taux de lymphocytes T CD8+ reste à peu près stable entre leurs 2 élevages (autour de 40 %). Ségalès *et al.* (2001)

expliquent le rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> plus faible dans l'élevage MAP<sup>+</sup> par une diminution du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (12 % contre 30 % dans l'élevage MAP<sup>-</sup>). Or nous observons dans notre étude longitudinale un taux moyen de lymphocytes T CD4 inférieur dans l'élevage MAP<sup>+</sup> dès le départ, à 3 semaines, avant le sevrage. Domingo *et al.* (2001), Nielsen *et al.* (2001) ont publié des articles relatant de la diminution du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (aucune donnée chiffrée n'est disponible dans ces articles) et en se basant sur des porcs, dans l'élevage MAP<sup>+</sup>, de 10-12 semaines d'âge sans suivi longitudinal. Darwich *et al.* (2002) ont montré sur des porcs de 8 à 12 semaines d'âge (sans suivi longitudinal) un taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> plus faible chez les porcs issus d'élevages MAP<sup>+</sup> par rapport à ceux issus d'élevages MAP<sup>-</sup> (5 % dans l'élevage MAP<sup>+</sup> et 15 % dans l'élevage MAP<sup>-</sup>). De même ils ont observés un taux de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> plus faible (17 %) dans l'élevage MAP<sup>+</sup> par rapport à l'élevage MAP<sup>-</sup> (27 %). Dans notre étude, deux groupes différents ont été ainsi observés avec une différence pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, moins nombreux dans l'élevage MAP<sup>+</sup> par rapport à l'élevage MAP<sup>-</sup>, ceci dès le départ, ce qui pourrait signer l'existence d'animaux moins compétents sur le plan immunitaire. Pour ce qui est des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, la différence est moins marquée ; ainsi la chute du rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> est essentiellement due aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Pour ce qui est du taux des cellules doublement marquées CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, nos résultats montrent une faible proportion (environ 4-8 % au cours du temps). Ceci n'est pas en accord avec les résultats de Lunney et Pescovitz (1987) où ils ont mis en évidence un fort taux de cellules doublement marquées CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (environ 25 %). En revanche Darwich *et al.* (2002) ont des résultats similaires aux notre avec de faibles taux (aux alentours de 5 % dans l'élevage MAP<sup>-</sup> et 2 % dans l'élevage MAP<sup>+</sup>). L'interprétation reste délicate dans la mesure où le rôle exact de ces cellules doublement marquée est encore inconnu (Salmon *et al.*, 1990).

Les résultats sur l'évolution du taux moyen de monocytes montrent, après sevrage, entre 3 et 10 semaines, une augmentation significative de 12 à 24 % dans l'élevage MAP<sup>-</sup> et une baisse chez les animaux de l'élevage MAP<sup>+</sup> n'ayant pas présenté de signes cliniques caractéristiques de la MAP (groupe B1), de 14 à 10 %. Une hausse est à noter dans le groupe ayant développé des signes cliniques de MAP (groupe B2), de 14 % à 43 %, cependant elle est difficilement interprétable car elle est due aux résultats d'un seul porcelet de ce groupe sur les 3 animaux. Peu d'études concernant l'évaluation des monocytes sont disponibles. Dans la littérature,



Ségalès *et al.* (2001) ont montré un taux important de monocytes dans l'élevage MAP+ avec 46 % chez des porcs de 10 semaines contre 18,5 % pour ceux de l'élevage MAP-.

Les monocytes jouent un rôle dans le contrôle initial des infections virales, en tant que précurseurs des macrophages. Dans notre étude, une augmentation significative des monocytes est observée dans l'élevage MAP- alors que dans l'élevage MAP+, les monocytes restent à un faible niveau. Cette déplétion en monocytes chez les animaux de l'élevage MAP+ pourrait avoir des conséquences sur l'efficacité des cellules présentatrices en antigènes que sont les macrophages. Nous avons montré que les animaux de l'élevage MAP+ sont restés plus longtemps porteurs du virus, ce qui pourrait être expliqué par une réponse immunitaire moins efficace dès le départ.

Une chute significative du taux de lymphocytes B a été observée entre 3 et 10 semaines, également après sevrage, dans les 2 élevages et dans des proportions similaires (de 19-20 % à 3 semaines à 11-14 % à 10 semaines). Ceci n'est pas en accord avec le suivi longitudinal de porcelets SPF de Joling *et al.* (1994) qui montre une hausse de ce taux au cours du temps (de 15 % à une semaine, 21% à 4 semaines et 20 % à 10 semaines). Les autres auteurs traitant de la MAP ont montré un taux de lymphocytes B plus faible dans l'élevage MAP+ par rapport à l'élevage MAP- (Ségalès *et al.*, 2001 ; Nielsen *et al.*, 2001, 2003 ; Darwich *et al.*, 2002) . En effet, Ségalès *et al.* (2001) ont obtenus un taux de 10,6 % dans l'élevage MAP+ sur les porcs de 10 semaines (comme nous pour les deux élevages suivis) contre 20 % dans l'élevage MAP-. Nielsen *et al.* (2001, 2003) ont rapporté sans l'avoir chiffré une chute du taux de lymphocytes B dans l'élevage MAP+. En revanche, Darwich *et al.* (2002) n'ont pas obtenu de différence dans ce taux entre les élevages MAP+ et MAP- (taux autour de 8-12 % sur des porcs de 8-12 semaines d'âge). L'interprétation dans notre étude reste difficile car il semblerait ne pas y avoir une atteinte des lymphocytes B puisque la même évolution est observée dans les 2 élevages et dans les mêmes proportions.

Les résultats sur l'évolution du taux moyen de cellules NK montre une augmentation entre 3 et 10 semaines pour les 2 élevages. Cependant dès le départ, ce taux est significativement plus élevé dans l'élevage MAP- (16 % à 3 semaines et 24 % à 10 semaines) par rapport à l'élevage MAP+ (7 % à 3 semaines et 20% à 10 semaines). Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce type de marquage. Nielsen *et al.*, (2003) ont montré une baisse du nombre de cellules NK après infection expérimentale chez des porcelets de 3 semaines. Ces résultats sont également en faveur d'une déplétion des cellules NK dans

l'élevage MAP+, sachant que les cellules NK ont une action cytolytique notamment sur les cellules infectées par des virus (lyse non spécifique).



## CONCLUSION GENERALE

Les résultats de cette étude montrent i) une circulation du PCV2 dans l'élevage MAP+ mais également dans l'élevage MAP- ; ii) une présence prolongée du PCV2 dans l'élevage MAP+ par rapport à l'élevage MAP- et iii) une déplétion des lymphocytes T CD4+, des monocytes et des cellules NK dans l'élevage MAP+.

Une circulation du PCV2 a pu être mise en évidence dans les 2 élevages suivis : MAP+ et MAP-. En effet, une immunité passive a été mise en évidence par un test ELISA sur matières fécales à une semaine d'âge dans les 2 élevages. D'autre part, une nette augmentation du taux moyen d'anticorps anti-PCV2, plus marquée dans l'élevage atteint de MAP, a été observée dans les 2 élevages entre 10 et 16 semaines. Cette augmentation peut être mise en relation avec une circulation du PCV2 dans les 2 élevages aux alentours de 10 semaines d'âge, ainsi que cela a pu être également observé par le suivi de l'infection par le PCV2 par PCR sur sérum et ELISA antigène sur matières fécales. Ces 2 tests ELISA anticorps et antigène sur matières fécales sont très pratiques d'utilisation et les résultats semblent prometteurs. Il s'agit maintenant d'évaluer les résultats obtenus par ELISA sur fèces avec d'une part, un suivi des anticorps anti-PCV2 au niveau sérologique par une méthode de référence telle que l'IPMA (Balasch *et al.*, 1999 ; Sanchez *et al.*, 2001) ou un test ELISA (Walker *et al.*, 2000 ; Blanchard *et al.*, 2003) sur sérum, et d'autre part, par un suivi par PCR sur matières fécales (Charreyre *et al.*, 2000). Notre nouvelle PCR nichée sera également testée prochainement sur matières fécales. Cette PCR nichée, mise au point avec des amorces nouvelles, et permettant de distinguer le PCV1 du PCV2, présente une grande sensibilité de détection (jusqu'à  $10^{-7}$  d'un PCV2 titrant à  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL sur sérum). Outre la prochaine validation de cette PCR nichée sur organes et matières fécales, les étapes suivantes seront d'évaluer le nombre de copies d'ADN que ce test peut réellement détecter et l'élaboration d'un contrôle d'amplification interne. Ce test PCR a permis de détecter un grand nombre d'animaux positifs sur sérum à partir de 10 semaines dans les deux élevages. Le test ELISA pour la recherche d'antigène utilisé à partir des matières fécales a permis également de mettre en évidence une augmentation du nombre de porcelets positifs entre 3 et 10 semaines dans les 2 élevages. Ces résultats permettent de montrer une circulation virale, une excrétion du PCV2 dans les matières fécales au sein des 2 élevages et de conforter ainsi l'hypothèse d'une transmission horizontale directe à partir des matières fécales (Calsamiglia *et al.*, 2002). La seule différence

entre les deux élevages réside en une présence prolongée du PCV2 dans l'élevage MAP+. En effet, aucun animal n'est détecté positif par ELISA (antigène) sur matières fécales à 16 semaines dans l'élevage MAP- alors que 30 % des animaux étaient encore positifs dans l'élevage MAP+ au même âge. De même, par PCR sur sérum, à 16 semaines, tous les animaux testés étaient positifs dans l'élevage MAP+ et aucun animal n'était redevenu négatif. Ce qui n'était pas le cas pour 25 % des animaux de l'élevage MAP- qui sont devenus négatifs entre 10 et 16 semaines.

De manière générale, dans les deux élevages, des variations des paramètres hématologiques et leucocytaires ont été observées au cours du temps, principalement après le sevrage, entre 3 et 10 semaines. Dans cette étude, une différence pour les lymphocytes T CD4+, significativement moins nombreux dans l'élevage MAP+ par rapport à l'élevage MAP-, est principalement observée, ceci dès le départ (à l'âge de 3 semaines) ; ce qui pourrait être du dans l'élevage MAP+, soit à l'existence d'animaux moins compétents sur le plan immunitaire, soit à une charge virale plus importante. A l'avenir, il serait intéressant de développer une PCR en temps réel afin de mesurer la charge virale et la comparer dans les 2 élevages, et d'éventuellement évaluer la variabilité génétique du PCV2 entre les 2 élevages (Jestin *et al.*, 2002). Une augmentation significative des monocytes a été observée dans l'élevage MAP- alors que dans l'élevage MAP+, les monocytes sont restés à un faible niveau. Dans l'élevage MAP+, l'infection par le PCV2 ne semble pas diminuer à 16 semaines, ce qui pourrait être expliqué par cette déplétion en monocytes. Une déplétion des cellules NK dans l'élevage MAP+ a été également observée dès l'âge de 3 semaines. En l'absence de données de références sur des animaux provenant d'élevages non infectés, la présence d'une différence des populations mononuclées du sang circulant suggère un déficit de la réponse immunitaire des animaux de l'élevage MAP+. L'étude de l'effet de facteurs alimentaires, environnementaux voire génétiques sur la maturation du système immunitaire du porcelet, permettrait de préciser le rôle de ces facteurs dans la pathogénie de la MAP.

Les importantes modifications observées dans notre étude au cours du temps montrent qu'il est important d'avoir un suivi longitudinal des porcelets, non seulement en ce qui concerne la dynamique de l'infection par le PCV2 mais aussi l'analyse des différentes populations cellulaires sanguines. Il faudra suivre d'autres élevages atteints de MAP et analyser d'autres paramètres notamment immunitaires avant de pouvoir émettre des hypothèses concernant le développement de signes cliniques chez certains porcs et pas chez les autres. Néanmoins, les

résultats de cette étude montrent, de manière générale, une présence prolongée du PCV2 dans l'élevage MAP+, avec dès 3 semaines d'âge, une déplétion des monocytes, des cellules NK et des lymphocytes T CD4+. Le statut immunitaire de l'hôte lui-même pourrait donc jouer un rôle important dans l'épidémiologie de l'infection par le PCV2.

**ANNEXE : protocole simplifié de l'extraction d'ADN**  
**(DNeasy tissue kit, Qiagen)**

- 1) Prélever 200 µL de sérum.
- 2) Ajouter 20 µL de PK (Protéinase K) et 200 µL de tampon AL (tampon de lyse) dans l'échantillon, mélanger par vortex et incuber à 70°C pendant 10 minutes
- 3) Ajouter 200 µL d'éthanol absolu et homogénéiser par vortex.
- 4) Pipeter le précipité ainsi formé et le déposer dans la colonne DNeasy (avec le tube de 2 mL). Centrifuger à plus de 6000 g pendant 1 minute. Eliminer le tube de 2 mL.
- 5) Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 mL, ajouter 500 µL de tampon AW1 (tampon de lavage) et centrifuger à plus de 6000 g pendant 1 minute.
- 6) Changer à nouveau le tube de 2 mL, ajouter 500 µL de tampon AW2 (tampon de lavage) et centrifuger 3 minutes à vitesse maximale (plus de 20000 g). La colonne doit être sèche, prendre garde à ne pas laisser en contact avec le résidu de lavage.
- 7) Placer la colonne dans un tube de 1,5 mL et pipeter 200 µL de tampon AE (tampon d'élution) directement sur la membrane de la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante, puis centrifuger à plus de 6000 g pendant 1 minute pour éluer.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- ALBINA E, TRUONG C, HUTET E, *et al.*  
An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) I growing piglets.  
J Comp Path, 2001, **125**, 292-303.
- ALBORALI GL, ZANONI MG, DAMINELLI P, *et al.*  
Comparison of immunofluorescence, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for the detection of porcine circovirus type 2 in naturally infected pigs.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 109.
- ALLAN GM, ELLIS JA.  
Porcine circoviruses: a review.  
J Vet Diagn Invest, 2000, **12**: 3-14.
- ALLAN GM, PHENIX KV, TODD D, *et al.*  
Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus.  
J Vet Med B, 1994, **41**, 17-26.
- ALLAN GM, KENNEDY S, MC NEILLY F, *et al.*  
Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus.  
J Comp Path, 1999, **121**, 1-11.
- ALLAN GM, MC NEILLY F, ELLIS J, *et al.*  
Experimental infection of colostrum deprived piglets with porcine circovirus 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) potentiates PCV2 replication.  
Arch Virol, 2000, **145**, 2421-2429.



- ALLAN GM, MC NEILLY F, MEEHAN BM, *et al.*  
Isolation and characterisation of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland.  
Vet Microbiol, 1999, **66**, 115-123.
  
- ALLAN GM, MC NEILLY F, KENNEDY S, *et al.*  
Immunostimulation, PCV-2 and PMWS.  
Vet Rec, 2000, **146**, 170-171.
  
- ALLAN GM, MEEHAN B, TODD D, *et al.*  
Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes.  
Vet Rec, 1998, **142**, 467-468.
  
- BACH JF.  
Cellules lymphoïdes  
In: PASTORET P-P, GOVAERTS A, BAZIN H.  
Immunologie animale  
France: Medecine-Science Flammarion, 1990, 35-49.
  
- BAIRD FJ, BOWN P, PEARSON RB, *et al.*  
Possible treatment options for PMWS/PDNS.  
Vet Rec, 2000, **146**, 619-620.
  
- BALASCH M, SEGALES J., ROSELL C, *et al.*  
Experimental inoculation of conventional pigs with tissue homogenates from pigs with Post-weaning multisystemic Wasting Syndrome.  
J Comp Path, 1999, **121**, 139-148.
  
- BERNARD F, POMMIER P, GAMBADE P, *et al.*  
Assessment of the efficacy of acetaminophen to control PMWS in field condition.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 142.

- BLANCHARD P, MAHE D, CARIOLET R, *et al.*  
An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome.  
Vet Microbiol, 2003, **94**, 183-194.
  
- BOLIN SR, STOFFREGEN WC, NAYR GP *et al.*  
Postweaning multisystemic wasting syndrome induced after experimental inoculation of caesarean-derived colostrums-deprived piglets with type 2 porcine circovirus.  
J Vet Diagn Invest, 2001, **13**, 185-194.
  
- BRUNET S, CHARREYRE C.  
Comparison of sequences of PCV2 strains.  
In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 17-20 September 2000, 629.
  
- CALSAMIGLIA M, SIBILA M, SEGALES J, *et al.*  
Detection of porcine circovirus type 2 in different routes of excretion : possible transmission routes and correlation with presence of postweaning multisystemic wasting syndrome characteristic lesions.  
In: Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, 2002, vol.1, 28.
  
- CHARREYRE C, BOEUF L, REYNAUD G, *et al.*  
Natural decrease of anti PCV2 maternal antibodies in conventional piglets.  
In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 17-20 September 2000, 580.
  
- CHARREYRE C, BOEUF L, BRUNET S, *et al.*  
Natural transmission of PCV2 in seronegative 9 week old pigs.  
In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 17-20 September 2000, 574.

- CHARREYRE C, BOEUF L, BRUNET S, *et al.*  
 No evidence of reactivation of PCV2 at farrowing time.  
In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 17-20 September 2000, 575.
  
- CHARREYRE C, BŒUF L, BUBLOT M, *et al.*  
 Virus neutralizing ability of anti-PCV2 antibody responses.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 100.
  
- DARWICH L, SEGALES J, DOMINGO M, *et al.*  
 Changes in CD4+, CD8+, CD4+CD8+, and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues.  
 Clin Diag Lab Immunol, 2002, **9**, 2, 236-242.
  
- DROLET R, D'ALLAIRE S, LAROCHELLE R, *et al.*  
 Viral agents identified from multifocal interstitial nephritis in slaughter pigs.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 106.
  
- ELLIS J, CLARK E, HAINES D, *et al.*  
 PMWS and other concurrent infections in the field.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 78.
  
- ELLIS J, HASSARD L, CLARK E, *et al.*  
 Imprint cytological examination in PMWS diagnosis.  
 Vet Rec, 2003, 148.

- ELLIS JA, KONOBY C, WEST KH, *et al.*  
Lack of antibodies to porcine circovirustype 2 in beef and dairy cattle and horses in western Canada.  
Can Vet J, 2001, **42**, 461-464.
  
- ELLIS J, KRAKOWKA S, LAIRMORE M, *et al.*  
Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets.  
J Vet Diagn Invest, 1999, **11**, 3-14.
  
- FERREIRA D, SANSOT B, LAVAL A.  
Attempt to use serotherapy to control mortality in PMWS.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 144.
  
- GAMBADE P, MORVAN H, AMENNA N.  
Maladie d'amaigrissement du porcelet : suivi clinique et anatomopathologique d'animaux malades isolés en infirmerie.  
Revue de médecine vétérinaire, 2000, **151**, 351-360.
  
- GHERPELLI M, MARTINEAU G-P.  
Le complexe « MAP/SDRP » : de l'Italie à la France en passant par l'Amérique du Nord.  
In: Proceedings Actualités en production porcine. Pathologie digestive en engraissement/Maladie d'amaigrissement du porcelet/Immunité-Vaccination (Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine), Maisons-Alfort, France, 5-6 décembre 2002, 73-79.
  
- HARDING JC.  
PMWS : emergence, clinical studies and PDNS.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 67-68.

- HARMS PA, SORDEN SD, HALBUR PG, *et al.*  
Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus.  
Vet Pathol, 2001, **38**, 528-539.
  
- ITP  
Document interne, 2001.
  
- ITP  
Le virus de la génétique.  
Pathogènes, 2001, 39.
  
- JESTIN A, MAHE D, BLANCHARD P, *et al.*  
Porcine circoviruses.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 72-74.
  
- JESTIN A, MAHE D, BLANCHARD P, *et al.*  
Protection of swine from PMWS coinfecting by porcine circovirus type 2 ORF 2 protein.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 109.
  
- JESTIN A, MAHE D, BLANCHARD P, *et al.*  
Maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP, actualités et hypothèses physiopathologiques).  
In: Proceedings Actualités en production porcine. Pathologie digestive en engraissement/Maladie d'amaigrissement du porcelet/Immunité-Vaccination (Association Française de Médecine Vétérinaire Porcine), Maisons-Alfort, France, 5-6 décembre 2002, 62-72.

- JOHNSON CS, HAN SJ, DIREKSIN K, *et al.*  
Experimental in utero inoculation of late-term swine fetuses with porcine circovirus type 2.  
J Vet Diagn Invest, 2002, **14**, 507-512.
  
- JOLING P, BIANCHI ATJ, KAPPE AL, *et al.*  
Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age.  
Vet Immunol Immunopath, 1994, **40**, 105-117.
  
- KANETO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML.  
Appendixes  
In: KANETO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML.  
Clinical biochemistry of domestic animals. Fifth Edition.  
USA: Academic Press, 1997, 891.
  
- KENNEDY S, MOFFETT D, MC NEILLY F, *et al.*  
Reproduction of lesions of Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus.  
J Comp Path, 2000, **122**, 9-24.
  
- KRAKOWKA S, ELLIS JA, MC NEILLY F, *et al.*  
Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus 2 (PCV-2).  
Vet Pathol, 2001, **38**, 31-42.
  
- KYRIAKIS SC, SAOULIDIS K, LEKKAS S, *et al.*  
The effects of immunomodulation on the clinical and pathological expression of Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome.  
J Comp Path, 2002, **126**, 38-46.

- LAROCHELLE R, MAGAR R, D'ALLAIRE S.  
Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome.  
Can J Vet Res, 2003, 67, 114-120.
  
- LAROCHELLE R, BIELANSKI A, MULLER P, *et al.*  
PCR detection and evidence of shedding of porcine circovirus type 2 in boar semen.  
J Clin Microbiol, 2000, **38** (18), 4629-4632.
  
- LE TALLEC B, POZZI N, BLANCHARD P, *et al.*  
Longitudinal study of boars naturally infected by PCV2.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 120.
  
- LUNNEY JK, PESCOVITZ MD.  
Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations.  
Vet Immunol Immunopath, 1987, **17**, 135-144.
  
- MADEC F, EVENO E, MORVAN P, *et al.*  
Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in France: clinical observations from follow-up studies on affected farms.  
Livestock production science, 2000, **63**, 223-233.
  
- MADEC F, ROSE N, EVENO E, *et al.*  
PMWS : on-farm observations and preliminary analytic epidemiology.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 86-88.

- MADEC F, ROSE N.  
Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome (PMWS) in pigs : a puzzling problem that animal hygiene can help to solve.  
International Symposium on Sustainable Livestock Production, Acapulco, Mexico, 22-24 february 2002.
  
- MANKERTZ A, MANKERTZ J, WOLF K, *et al.*  
Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus.  
J Gen Virol, 1998, **79**, 381-384.
  
- MARTELLI P, BORGHETTI P, DE ANGELIS E, *et al.*  
Haematological parameters and leukocyte populations in pigs naturally infected with porcine circovirus type 2.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 98.
  
- MARTELLI P, GUAZZETTI S, CORDIOLI P, *et al.*  
Longitudinal analysis of anti PCV1 and PCV2 antibodies in conventional piglets ageing 0-100 days.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 118.
  
- MEEHAN BM, CREELAN JL, MC NULTY MS, *et al.*  
Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses  
J Gen Virol, 1997, **78**, 221-227.
  
- MEYER DJ, HARVEY JW.  
Appendix: reference intervals and conversion tables.  
In: MEYER DJ, HARVEY JW  
Veterinary laboratory medicine. Interpretation and diagnosis. Second Edition.  
USA: W.B. Saunders Company, 1998, 345.



- MOROZOV I, SIRINARUMITR T, SORDEN SD, *et al.*  
 Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.  
 J Clin Microbiol, 1998, **36**, 2535-2541.
  
- MURPHY FA, FAUQUET CM, BISHOP DHL, *et al.*  
 Circoviridae  
In : MURPHY FA, FAUQUET CM, BISHOP DHL, *et al.*  
 Virus taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.  
 Wien: Springer-Verlag, 1983, 166-168.
  
- MURPHY FA, GIBBS EPJ, HORZINEK MC, *et al.*  
 Circoviridae  
In: MURPHY F.A., GIBBS EPJ, HORZINEK MC, *et al.*  
 Veterinary Virology. Third Edition.  
 USA: Academic press, 1999, 357-361.
  
- NAWAGITGUL P, MOROZOV I, SIRINARUMITR T, *et al.*  
 Development of probes to differentiate porcine circovirus types 1 and 2 in vitro by in situ hybridization.  
 Vet Microbiol, 2000, **75**, 83-89.
  
- NAWAGITGUL P, MOROZOV I, BOLIN SR, *et al.*  
 Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein.  
 J Gen Virol, 2000, **81**, 2281-2287.
  
- NIELSEN J, LADEKJAER-MIKKELSEN AS, ALLAN G, *et al.*  
 Experimental infection of 3-week-old piglets with PCV2 altered the level of various peripheral blood leukocyte populations.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 96.

- NIELSEN J, VINCENT IE, BOTNER A, *et al.*  
 Association of lymphopenia with porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).  
 Vet Immunol and Immunopathol, 2003, **92**, 97-111.
  
- O'CONNOR B, GAUVREAU H, WEST K, *et al.*  
 Multiple porcine circovirus 2 associated abortions and reproductive failure in a multisite swine production unit.  
 Can Vet J, 2001, **42**, 551-553.
  
- O'CONNOR M, MC NEILLY F, MC NAIR I, *et al.*  
 Comparison and application of gel-based PCR procedures for detection of PCV2 and diagnosis of PMWS.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 105.
  
- PALLARES FJ, HALBUR PG, OPRIESSNIG T, *et al.*  
 Porcine circovirus type 2 (PCV-2) coinfections in US field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS).  
 J Vet Diagn Invest, 2002, 14, 515-519.
  
- PASTORET P-P, GRIEBEL P, BAZIN H, GOVAERTS A.  
 Immunology of the pig.  
 In: PASTORET P-P, GRIEBEL P, BAZIN H, GOVAERTS A  
 Handbook of vertebrate immunology.  
 London: Academic Press, 1998, 373-419.
  
- PENZAERT MB, SANCHEZ RE, NAUWYNCK HJ.  
 Transmission of porcine circovirus type 2 from the sow to the litter.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 84-85.

- POZZI N, BLANCHARD P, MAHE D, *et al.*  
Boar PCV2 seroprevalence in artificial insemination centers.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 124.
  
- POGRANICHNIY RM, YOON KJ, HARMS A, *et al.*  
Case-control study on the association of porcine circovirus type 2 and other swine viral pathogens with postweaning multisystemic wasting syndrome.  
J Vet Diagn Invest, 2002, **14**, 449-456.
  
- QUINTANA J, SEGALES J, ROSELL C, *et al.*  
Clinical and pathological observations on pigs With PMWS.  
Vet Rec, 2001, **149**, 357-361.
  
- RODRIGUEZ-ARRIOJA GM, SEGALES J, CALSAMIGLIA M, *et al.*  
Dynamics of porcine circovirus type 2 infection in herd of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome.  
AJVR, 2002, **63**, 3, 354-357.
  
- ROSE N, LAROUE G, LE DIGUERHER G, *et al.*  
Serological profile of porcine circovirus type 2 in PMWS affected and non-affected farms.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 117.
  
- ROSELL C, SEGALES J, DOMINGO M.  
Hepatitis and staging of hepatic damage in pigs naturally infected by porcine circovirus type 2.  
Vet Pathol, 2000, **37**, 687-692.
  
- ROYER RL, NAWAGITGUL P, HALBUR PG, *et al.*  
Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants.  
Journal of swine health and production, 2001, **9**, 6, 281-284.

- SALMON H, VAIMAN M, SCHREUER D  
Immunologie du porc.  
In: PASTORET P-P, GOVAERTS A, BAZIN H.  
Immunologie animale.  
France : medecine-science Flammarion, 1990, 565-582.
  
- SANCHEZ RE, NAUWYNCK HJ, MC NEILLY F, *et al.*  
Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculation at different stages of gestation.  
Vet Microbiol, 2001, **83**, 169-176.
  
- SARLI G, MANDRIOLI L, LAURENTI M, *et al.*  
Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pigs PMWS.  
Vet Immunol Immunopath, 2001, **83**, 53-67.
  
- SEGALES J, DOMINGO M.  
Postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. A review.  
Vet Quarterly, 2002, **24**, 3, 09-124.
  
- SEGALES J, PASTOR J, CUENCA R, *et al.*  
Haematological parameters in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs.  
Vet Rec, 2000, **146**, 675-676
  
- SEGALES J, AONSO F, ROSELL C, *et al.*  
Changes in peripheral blood leukocyte populations in pigs with natural PMWS.  
Vet Immunol Immunopath, 2001, **81**, 37-44.
  
- SEGALES J, ROSELL C, DOMINGO M.  
Pathological findings of postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning mutisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 69-71.

- SHIBATA I, OKUDA Y, YAZAWA S, *et al.*  
 PCR detection of porcine circovirus type 2 DNA in whole Blood, serum, oropharyngeal swab, and feces from experimentally infected pigs and field cases.  
 J Vet Med Sci, 2003, **65**, 3, 405-408.
  
- SIBILA M, CALSAMIGLIA M, SEGALÉS J, *et al.*  
 Detection of porcine circovirus type 2 genome in nasal swabs and serum samples from naturally infected pigs using polymerase chain reaction.  
In: Proceedings ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome (European Society of Veterinary Virology), Saint Malo, France, 24-27 september 2001, 115.
  
- SORDEN SD.  
 Update on porcine circovirus and PMWS.  
 Swine health and production, 2000, **8**, 3, 133-136.
  
- TISCHER I, GELDERBLUM H, VETTERMANN W, *et al.*  
 A very small porcine virus with circular single-stranded DNA.  
 Nature, 1982, **295**, 64-66.
  
- TISCHER I, BODE L, APODACA J, *et al.*  
 Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice, and cattle.  
 Arch Virol, 1995, **140**, 1427-1439.
  
- WALKER IW, KONOBY A, JEWHRST A, *et al.*  
 Development and application of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to porcine circovirus type 2.  
 J Vet Diagn Invest, 2000, **12**, 400-405.

- WATSON, GILMAN, WITKOWSKI, *et al.*

La réaction de polymérisation en chaîne.

In: WATSON, GILMAN, WITKOWSKI, *et al.*

ADN recombinant. 2<sup>e</sup> Edition.

Bruxelles: De Boeck Université, 1994, 79-98.

- WELLENBERG GJ, PESCH S, BERNDSEN FW, *et al.*

Isolation and characterization of porcine circovirus type 2 from pigs showing signs of post-weaning multisystemic wasting syndrome in the Netherlands.

Vet quarterly, 2000, **22**, 167-172.

- WEST KH, BYSTROM JM, WOJNAROWCZ C, *et al.*

Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2.

J Vet Diagn Invest, 1999, **11**, 530-532.









